

REC'D 06 JAN 2005

WIPO PCT

# KONINKRIJK BELGIË



Hierbij wordt verklaard dat de aangehechte stukken eensluidende weergaven zijn van bij de octrooiaanvraag gevoegde documenten zoals deze in België werden ingediend overeenkomstig de vermeldingen op het bijgaand proces-verbaal van indiening.

Brussel, de -3.-12-2004

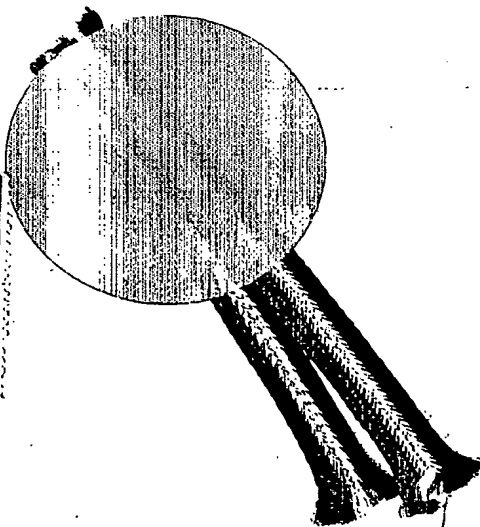
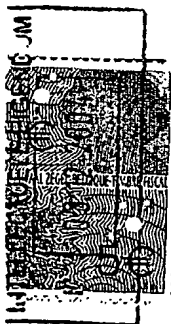
Voor de Directeur van de Dienst  
voor de Industriële Eigendom

De gemachtigde Ambtenaar,

24 12 2004  
EPO-DG 1  
(43)

BAILLEUX G.  
Adjunct-Adviseur

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 06 JAN 2005

WIPO PCT

PROCES-VERBAAL VAN INDIENING  
VAN EEN OCTROOIAANVRAAG

Nr: 2004/0028

Regulering en  
Organisatie van de markten

Dienst voor de Intellectuele Eigendom

Heden, 19/01/2004 te Brussel, om 11 uur 10 minuten

biedt Dhr. / Mevr. HUYBRECHTS Lucas

Handelend als

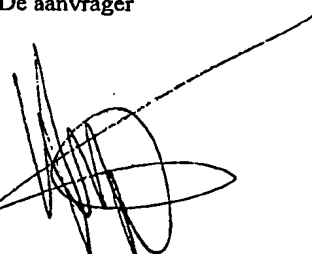
- ☒ Aanvrager.
- ☐ Werknemer van de aanvrager.
- ☐ Werknemer van een werkelijke vestiging van de aanvrager.
- ☐ Erkende gemachtigde
- ☐ Werknemer van een erkende gemachtigde, Dhr. / Mevr.
- ☐ Advocaat

zich aan bij de DIENST VOOR DE INDUSTRIELE EIGENDOM en dient er een aanvraag in tot het bekomen van een uitvindingsoctrooi met betrekking tot ANTICARIOGENE PROTEINEN & PEPTIDEN & SACCHARIDEN.

gevraagd door HUYBRECHTS Lucas  
Mina Telghuislaan, 9  
2550 KONTICH

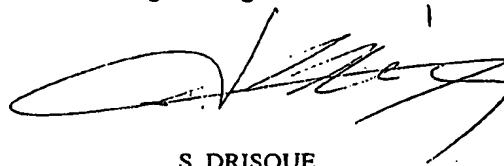
De aanvraag, zoals ingediend, bevat de documenten die overeenkomstig artikel 16, § 1 van de wet van 28 maart 1984 vereist zijn tot het verkrijgen van een indieningsdatum.

De aanvrager



Brussel, 19/01/2004

De gemachtigde ambtenaar



S. DRISQUE.

## Anticariogene proteïnen & peptiden & sacchariden

### 5 Technisch vakgebied

Caries wordt veroorzaakt door zuren die het tandoppervlak aantasten en die door bacteriën geproduceerd worden.

- Deze uitvinding handelt over proteïnen, peptiden en sacchariden die tanden kunnen beschermen tegen deze zuuraanvallen. De uitvinding omvat zowel  
10 de ontdekking van de moleculaire structuur van de actieve producten en van de processen om ze te maken, als van de eindformuleringen en het gebruik ervan voor een betere bescherming van het gebit bij patiënt en consument.

### Stand der techniek

- 15 Het is algemeen bekend dat caries veroorzaakt wordt door zuren die geproduceerd worden door mondbacteriën. Suikers zoals glucose zijn een belangrijke voedingsbron voor de bacteriën zonder dewelke de productie van zuren niet mogelijk is. Streptococcus mutans (S. mutans) wordt beschouwd als een belangrijke veroorzaker van caries, gedijt goed in het  
20 mondgebied en is een belangrijke zuurproducent. S. mutans produceert ook glucosyltransferase enzymen die op hun beurt de vorming catalyseren van kleverige glucanen en fructanen, die de bacterie gebruikt voor hechting aan tand en plaque. Het speeksel bevat bufferende substanties die het zuur enigzins neutraliseren en bezit eveneens een calcium en fosfaat bron die  
25 ingezet wordt bij herstelwerk van het aangetaste glazuur. Desondanks is de bescherming van speeksel onvoldoende en wordt het tand-glazuur aangetast en gedemineraliseerd bij regelmatig herhaalde opstoten van zuurproductie. Op langere termijn kunnen gaten ontstaan in het tandoppervlak, pijn op het niveau van de tandzenuw met mogelijk verlies van de tand.
- 30 Tijdens de laatste tientallen jaren heeft het gebruik van fluoride voor de reductie van caries een enorme bloei gekend. Talloze studies tonen het inhiberende effect van fluoride aan, dat gestoeld is op de competentie om het demineraliseringsproces te vertragen en de remineralizatie te versnellen
- 35 (US 5.089.255)(Dental Caries, O. Fejerskow et al; Blackwell Munksgaard, 2003, ISBN 1-4051-0718-9). Het gebruik van sommige co-ingrediënten in combinatie met fluoride, bijvoorbeeld zink-verbindingen, hebben een versterkt beschermend effect (US 4.396.599). Desondanks is de beschermende werking van fluoride beperkt tot 20 a 30% van de caries die  
40 zou optreden, indien geen gebruik zou gemaakt worden van fluoride. Daarenboven is fluoride toxicologisch niet onbesproken, waardoor de U.S. Food and Drug Administration (FDA) het gebruik ervan in tandpasta's voor thuisgebruik beperkt heeft tot 1150 ppm maximum.

In een meer recent verleden is ijverig gezocht naar andere oplossingen; hierbij kan men een onderverdeling maken in een vijftal strategieën:

1. De vernietiging van bacterien, 2. De reductie van de zuur-productie, 3. De bemoeilijking van kolonie-vorming door de hechting van bacterien aan het tandoppervlak en de vorming van plaque te beletten, 4. het versnellen & versterken van herstelwerk met calcium en fosfaat ionen en 5. de absorptie van zuren ter hoogte van het tandoppervlak.
- 10 1. De vernietiging van bacterien. Er zijn een hele resem natuurlijke produkten geïdentificeerd die een antibiotische werking demonstreren tegen mondbacterien; het betreft bijvoorbeeld lantibiotische peptiden (US 4209508; US pending 20030118590) van bacterien, lytische enzymen van bacteriophagen die de celwand van streptococcus mutans kunnen perforeren
- 15 (US 6355012, US 6399098), extracten van gist-cellen (US 4.980.151) of componenten van natuurlijke oliën zoals Cubeb olie of java citronella olie (US 4.590.215: Alpha-cadinol). Ook de extracten van planten zoals Angelica Gigas, Akebia quinata, Camellia sinensis en Korean Ginseng Flower (J. Dent. Res. 2003;vol 82, spec. issue B,1591 and 1670) blijken
- 20 antibiotische werking te demonstreren. Daarnaast zijn er synthetische antimicrobiele producten ontwikkeld met competentie tegen streptococcus mutans: N-alkyl-pyridinium chloride, bisbiguanides (chloorhexidine, US 6.143.281) quaternaire ammoniumgalacto-mannanen (US 4.282.204), polyphenolen (triclosan; US 6.136.298), gemodificeerde histatine-peptiden
- 25 (US 5.672.351). Een andere methodiek bestaat erin een immunologische reactie op te wekken tegen S. mutans door peptiden die structuuridentiek zijn aan delen van het S. mutans antigen I/II (een celwand proteïne; US 6.024.958 en US 6.500.433), of anti-bodies tegen het S. mutans antigen I/II en die in een
- 30 andere gastheer geproduceerd zijn, toe te dienen (US 5.612.031). Sommigen verwijzen naar de rechtreekse toediening van bacteriophagen ter bestrijding van S. mutans (US 4.957.686 en US 4.891.210).
- 35 2. De zuurproductie kan belemmerd worden door toediening van suikers zoals erythritol (US 6.238.648, US 6.177.064, US 4.346.116), xylitol, trehalose, palatinose (US 5.985.622). Alhoewel ze zinvol ingezet worden in voedingsmiddelen, is het toch een nadeel dat grote hoeveelheden van het goedkopere-glucose dienen vervangen te worden en dat ze bij langdurig of veelvuldig gebruik een laxerende werking hebben.
- 40 3. De hechting van S.mutans aan het tandoppervlak kan op diverse manier bemoeilijkt worden: gebruik van pyrofosfaten en ZnO beperkt de plaque vorming en vermindert de hechtingskansen (US 5.455.024); glucanasen en

dextranase van oa. melkzuurbacterien breken de glucanen af die bacterien gebruiken om zich te hechten aan de plaque (US 5.468.479); een peptide vaccin kan gebruikt worden dat een immunologische reactie oproept tegen het enzyme (glucosyltransferase) dat de glucaan produktie activeert (US 5.686.075); peptiden met een structuur die overeenkomt met delen van het S. mutans antigen I/II kunnen wedijveren met het antigen voor koppeling aan de plaque (US 6.500.433).

4. Herstelwerk. Calcium en fosfaat behoren tot de bestanddelen van speeksel en nemen deel aan het herstel van appatiet. Natuurlijke proteïnen en peptiden worden gebruikt om grotere hoeveelheden Ca en fosfaat te binden, zodat het neerslaan van calcium fosfaten vermeden worden. Hierdoor kunnen grotere hoeveelheden Ca en fosfaat ter beschikking gesteld worden voor herstelwerk aan het tandoppervlak. Casein (US 5.130.123) en vooral niet-gedenatureerd casein (US 5.427.769) hebben een anti-cariogeen effect; net zoals trouwens de caseinfosfopeptiden (CPP) die bij middel van enzymatische hydrolyse gewonnen worden uit casein (US 5.015.628). Dankzij complexatie met calcium ionen kan CPP zich ook cumuleren op het tandoppervlak en lokaal een bufferende werking uitoefenen.

5. Coating op het tandoppervlak & zuurabsorptie. Deze strategie bestaat erin het zuur preferentieel te laten reageren (in chemisch vakgebied ook wel "neutralisatie" genoemd) met een beschermend produkt eerder dan met het appatiet van tand. Hiervoor wordt hoofdzakelijk gebruik gemaakt van een basische component: arginine of amine. Daarom wordt het arginine aminozuur en kleine peptiden (2-4) die minstens één arginine aminozuur bevatten, ingezet om de basiciteit van de plaque te verhogen (US 6.21.851, US 4.225.579, US 5.762.911 en Kanapka, Archs. oral. Biol. 28,1007-1015,1983). Ook chitosan (zouten) worden aanbevolen (US 4.512.968). Ze zijn evenwel niet oplosbaar in water onder neutrale of basische omstandigheden hetgeen hun inzetbaarheid beperkt. Een ander polyamine, polyethyleenimine fluorofosfaat, blijkt te hechten aan het tandoppervlak en het te beschermen (US 4.020.019) tegen zuuraanvallen. Een nadeel is wel dat polyethyleenimine bekend staat als een irriterende stof die toxisch is bij inname hetgeen de bruikbaarheid beperkt. Het basische polymeer hecht zich goed aan celwanden en is niet enzymatisch afbreekbaar door het metabolisme. Het is bekend dat statherin, een peptide in speeksel, in staat is om te hechten aan het tandoppervlak. De natuur maakt gebruik van fosfaat groepen of van een samenspel van fosfaat en carboxylaat groepen om een hechting aan het tandoppervlak mogelijk te maken. Phosvitin, een proteïne uit eigeel met zeer hoge fosfaat dosering, vertoont eveneens een goede

- hechtkracht en blijkt een beschermende invloed uit te oefenen (US 5.279.814 en B.Jiang et al, Biosci. Biotechnol. Biochem., 65 (5), 1187-1190,2001 en B.Jiang et al, J. Agric. Food Chem.,48, 990-994,2000 en A. Goulas et al, J. of Protein Chemistry, vol 15, no.1, 1-9,1996).

5 Ondanks de vele creatieve research activiteiten komt caries nog veelvuldig voor. Epidemiologisch onderzoek in Europa tijdens de jaren negentig bevestigt dat het gebit van velen nog steeds aangetast is : 99% bij Duitsers tussen 35-44 jaren oud , 94% bij Italianen tussen 35-44 jaren en 40% bij  
10 Belgische kinderen tussen 5 en 7 jaren. Daarom is het nodig om nieuwe produkten te ontwikkelen die een bijdrage kunnen leveren tot het terugdringen van deze ziekte.

### Bijlagen

- 15 Bijlage 1. Een schematische voorstelling van de homo- of copolymerisatie van peptiden met een carbodiimide.  
Bijlage 2: De fosfonylering van epsilon-polylysine met een bisgefosfonyleerd epoxide.  
Bijlage 3: De fosfonylering van chitosan met fosfomycin.  
20 Bijlage 4: De reactie van epsilon-polylysine met 3-hydroxy-phthalic anhydride.  
Bijlage 5: De kwetsbaarheid van anaeroben geïsoleerd in het mondgebied en van standaard strains in aanwezigheid van de produkten (22), (6), (10) en (27).  
25 Bijlage 6: De kwetsbaarheid van microaerophilische bacterien geïsoleerd in het mondgebied in aanwezigheid van de produkten (22), (6), (10) en (27).  
Bijlage 7: The kwetsbaarheid van schimmels (yeast like) geïsoleerd in het mondgebied en van standaard strains in aanwezigheid van de produkten nr (22), (6), (10) en (27).  
30 Bijlage 8: De kwetsbaarheid van aeroben geïsoleerd in het mondgebied en van standaard strains in de aanwezigheid van de produkten nr (22), (6), (10) en (27).  
Bijlage 9: De kwetsbaarheid van Streptococcus spp. strains geïsoleerd in het mondgebied en van een standaard strain in aanwezigheid van de  
35 produkten no. (22), (6), (10) en (27).  
Bijlage10: Knoop experiment: Penetratie in het tandoppervlak na 4 behandelingen met NaF, (gemodificeerd) Phosvitin of gemodificeerd epsilon-polylysine en met 0.1N-azijnzuur.  
Bijlage 11: Knoop experiment: Penetratie in het tandoppervlak na 4  
40 behandelingen met (gemodificeerde) casein fosfopeptiden en met 0.1N azijnzuur.

### Uitvinding

- 5 Wij hebben proteïnen & peptiden & sacchariden ontdekt die een sterke beschermkracht vertonen tegen caries door hechting aan het tandoppervlak en door neutralisatie van zuren (overeenkomstig het werkingsprincipe dat vermeld staat in de stand der techniek, onderdeel 5) en/of door complexatie met calcium en fosfaat voor herstelwerk aan het tandoppervlak (overeenkomstig het werkingsconcept in de stand der techniek, onderdeel 4).
- 10 Allen bevatten ze meerdere fosfaat- of fosfonaatgroepen, al dan niet in aanwezigheid van aminogroepen.
- De meerderheid van deze produkten zijn nieuw en er werden door ons aangepaste produktieprocedures ontdekt. Hiertoe horen de volgende produkten: polyamines zoals bisgefosfonyleerd epsilon-polylysine (elys-
- 15 bisfo), bisgefosfonyleerd gehydrolyseerd chitosan (hi-chit-bisfo) en gefosfonyleerd chitosan (chit-fos), polyfosfaten zoals gepolymeriseerd caseinfoseptide (CPP)<sub>n</sub>, partieel gehydrolyseerd fosvitin (Phos-h) en (Phos-h) gepolymeriseerd tot (Phos-h)<sub>n</sub>, copolymeren van polyamines en polyfosfaten zoals het copolymeer van caseinfoseptide en epsilon-
- 20 polylysine (CPP x elys)<sub>n</sub>, het copolymeer van caseinfoseptide en gehydrolyseerd chitosan (CPP x hi-chit)<sub>n</sub>, het copolymeer van partieel gehydrolyseerd fosvitin en epsilon-polylysine (Phos-h x elys)<sub>n</sub> en het copolymeer van partieel gehydrolyseerd fosvitin en gehydrolyseerd chitosan (Phos-h x hi-chit)<sub>n</sub>.
- 25 De innovativiteit van onze produkten ten opzichte van de reeds bestaande "prior art" produkten is in het algemeen gebaseerd op vier fundamentele en vernieuwende eigenschappen: sterkere hechtkracht op het tandoppervlak door het gebruik van nieuwe componenten met verhoogde hechtcompetentie
- 30 , sterkere hechtkracht op het tandoppervlak door de aanwezigheid van een groter aantal hechtcomponenten per molecuul, de aanwezigheid in één molecuul van twee soorten componenten (één voor hechting aan tand en één voor neutralisatie van zuur) en het gebruik van afbreekbare peptiden en sacchariden met een veilig toxiciteitsprofiel. Sommige produkten vertonen
- 35 bovendien antimicrobiele activiteiten tegen organismen die voorkomen in de mond.
- Wij hebben ontdekt dat de toevoeging van bisfosfonyl groepen of 3-hydroxyphthalaat groepen in een molecuul de beschermcompetentie in
- 40 belangrijke mate verhoogd. Zonder gebonden te zijn aan enige verklarende hypothese wordt ervan uitgegaan dat de calcium complexerende competentie van deze produkten de hechtkracht aan het tandoppervlak versterkt. We hebben eveneens ontdekt dat de beschermcompetentie van

phosvitin kan verbeterd worden door het phosvitin vooafgaandelijk te behandelen met trypsin, pepsin of met beide enzymen. De efficiënte peptiden en sacchariden uit de prior art zijn relatief kleine moleculen (zoals caseinfosfopeptide, arginine en kleine peptiden (2 a 4 aminozuren) met arginine. Wij hebben ontdekt dat de beschermcompetentie kan verbeterd worden door gebruik te maken van moleculen met een hoger moleculair gewicht. Zonder gebonden te zijn aan enige verklarende hypothese wordt ervan uitgegaan dat een vergroting van het aantal hechtcomponenten per molecuul de hechtkracht verbetert. Wij hebben immers ontdekt dat de polymerisatie van caseinfosfopeptide (CPP; Mw ongeveer 2kdal) de beschermkracht verhoogt en dat door hydrolyse van Phosvitin (Mw ongeveer 35 kdal) tot hydrolysaten (met een Mw van 3kdal) de oorspronkelijk goede beschermkracht tegen zuren bijna volledig verloren gaat. Wij hebben eveneens ontdekt dat een polyamine als epsilon-polylysine een substantieel betere beschermkracht biedt dan kleine mono-amines (Tris) onafgezien het gebruik van een identieke molaire concentratie aan aminegroepen. We hebben eveneens ontdekt dat peptiden, proteïnen en sacchariden met een "hoge dosering" aan zowel fosfaten (of fosfonaten) als amines in één molecuul, relatief zeer hoge beschermingscompetentie bieden. Deze produkten komen niet voor in de prior art. Het betreft gefosfonyleerde polypeptiden en polysacchariden of conjugaten van fopeptiden met aminopeptiden of aminosacchariden. Zonder gebonden te zijn aan enige hypothese wordt er van uitgegaan dat deze competentie wordt verkregen door de gezamenlijke aanwezigheid in één molecuul van componenten die superieur zijn in termen van zuur neutralisatie (amines of guanidine) en componenten die superieure hechtkracht leveren (fosfaten, fosfonaten, bisfosfonaten, hydroxyphthalaten). De vereniging van twee nuttige eigenschappen in één molecuul komt de werking ten goede. (Een zuur absorberend molecuul is effectiever als het ook goed hecht aan het tandoppervlak en niet weggespoeld wordt met het speeksel).. De nieuwe produkten behoren tot de klasse van peptiden en sacchariden en zijn metabolisch afbreekbaar; daardoor hebben ze een beter toxicologisch profiel dan overeenkomstige "prior art" polymeren op basis van een koolstofketen (bijvoorbeeld polyethyleenimine).

De beschermkracht tegen caries wordt gemeten met een techniek die algemeen bekend is in de sector (US 5.279.814). Het is bekend dat de hardheid van het tandoppervlak daalt, bij de demineralisatie met zuren. De hardheidsgraad kan gemeten worden aan de hand van de penetratiediepte van een diamanten naald in het tandoppervlak (microhardheidsmeting). Deze techniek staat bekend onder de naam KNOOP; de naald laat een afdruk na bij het penetreren onder constant gewicht in het tandoppervlak.



- Hoe meer het demineraliseringsproces gevorderd is, hoe zachter de tand, hoe dieper de naald zal penetreren (Knoop, F., Peters C.G., Emerson W.B., A Sensitive Pyramidal Diamond Tool for Indentation Measurements, J. Res. Natn. Bur. Stand. 23, 39-61 (1939). De procedure houdt in dat men de hardheid van een onbehandeld tandmonster meet met de Knoop methode. Dan wordt het tandmonster buiten het mondgebied gecoat met een beschermingsprodukt. Na drogen wordt het zachtjes geboend (zonder beschadiging van het oppervlak) tot de coating onzichtbaar is. Het monster wordt dan geruime tijd ondergedompeld in een bad van natuurlijk speeksel om de mondomstandigheden te simuleren. Het tandmonster wordt daaropvolgend behandeld met een zuuroplossing. Dan wordt de hardheidsdaling gemeten ten opzichte van de niet behandelde tand door het meten van de verandering in penetratiediepte ( $\Delta P$  in  $\mu m$ ); het experiment wordt herhaald, met dit verschil dat de tand alleen maar met zuur behandeld geweest is en niet met een experimenteel produkt. Dat levert het penetratie-effekt op van zuur op een zuivere tand ( $\Delta P_a$ ). De beschermende kracht ("PF" protection factor) van een experimenteel produkt kan als volgt uitgedrukt worden:
- $$PF = 100 - \Delta P * 100 / \Delta P_a$$
- (PF van produkt x = 35 betekent dat een tand met een coating van produkt x een hardheidsdaling vertoont onder invloed van zuur die 35% lager is dan de daling bij gebruik van zuur op een tand zonder coating).

25

#### De Produkten: Fosfopeptiden

- In één aspect van de uitvinding bleek, verrassenderwijze, dat caseinfosfopeptide (CPP)n dat gepolymeriseerd werd met een carbodiimide, een betere beschermkracht biedt dan niet-gepolymeriseerd caseinfosfopeptide (CPP). Zonder gebonden te zijn aan enige hypothese wordt vermoed dat het hogere moleculair gewicht en het grotere aantal beschikbare hechtcomponenten, de hechting aan het tandoppervlak verbetert. Dit wordt ook bevestigd door onze ontdekking dat gehydrolyseerd Phosvitin (PPP; Mw 1-3 kdal) een minder goede beschermkracht biedt dan het natuurlijke Phosvitin (Mw > 30 kdal). Ook anorganisch fosfaat (produkt III), biedt geen beschermkracht (zelfs niet bij pH 9). Het (CPP)n kan gebruikt worden bij een concentratie van 0.01% tot 30% (en bij voorkeur tussen de 1 en 10%; op gewichtsbasis) in de eindformulering die gebruikt wordt voor de behandeling van het gebit. CPP is goed oplosbaar in water en de polymerisatie van caseinfosfopeptide kan uitgevoerd worden bij elke concentratie waarbij CPP oplosbaar is in water (bij voorkeur tussen 5% en 30% en het liefst tussen 8% en 20%); De verhouding CPP/carbodiimide is bij voorkeur tussen 1/1.5 en 1/0.05 op

- gewichtsbasis en de pH is tussen 5 en 9. In water wordt bij voorkeur gebruik gemaakt van 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide. Afhankelijk van de pH dient men een carbodiimide dosering te kiezen die geen "over-crosslinking" teweeg brengt waardoor het produkt (gedeeltelijk) onoplosbaar zou kunnen worden. Als alternatief kan men gebruik maken van carbodiimides die oplosbaar zijn in solventen zoals DMSO (vb. cyclohexylcarbodiimide). De reactie kan evenwel ook met andere klassieke peptide-koppelingsmiddelen doorgevoerd worden die via de amine-functies koppelen; enkele voorbeelden (zonder volledig te zijn): dimethyl suberimide, dimethyl pimelimide, diethyl malonimide, dimethyl adipimide, bisepoxides, bis-isocyanaten, glutaraldehyde,.....
- De temperatuur tijdens de reactie kan tussen 0 tot 60°C zijn (bij voorkeur 15-30°C).
- 15 In een ander aspect van de uitvinding werd, verassenderwijze, gevonden dat (gedeeltelijk) gehydrolyseerd phosvitin (Phos-h; Mw 22 a 30 kdal), bekomen door een behandeling van Phosvitin met het trypsin enzyme, een 25% betere beschermkracht biedt dan het natuurlijke phosvitin. Zonder gebonden te zijn aan enige hypothese wordt ervan uitgegaan dat het enzyme
- 20 het uiteinde van het proteïne knipt (aminozuur 1 tot 48 aan de amine zijde), zodat enkele hydrofobe aminozuren verwijderd worden en het resterende gedeelte nog steeds relatief groot is (> 25 kdal), bijna uitsluitend hydrofiele gefosforyleerde serine aminozuureenheden bevat, waardoor het een conformatie aanneemt die verschillend is van dat van het natuurlijk
- 25 phosvitin, waardoor het beter hecht aan het tandoppervlak. Het gehydrolyseerde phosvitin (Phos-h) kan ingezet worden bij een concentratie van 0.01% tot 30% (en bij voorkeur tussen de 1 en 10%) in de eindformulering die gebruikt wordt voor de behandeling van het gebit. De hydrolyse van phosvitin in water kan uitgevoerd worden bij een pH van 5 tot
- 30 9 (bij voorkeur 8) met een trypsin/substrate ratio van 0.1% tot 50% (bij voorkeur 0.5 to 10%) en bij een temperatuur van 0 C tot 70 °C (bij voorkeur 20 a 40°C) met een reactietijd tot 24 uur en meer. Desgevallend kan chymotrypsin gebruikt worden ipv trypsin en/of aangevuld worden met een behandeling met pepsin bij pH 2-7 (bij voorkeur pH 2 tot 3). Het pepsin
- 35 verwijdert de laatste hydrofobe aminozuren. Zonder gebonden te zijn aan een hypothese kan vermoed worden dat (Phos-h) het 28kdal segment van Phosvitin bevat (Gln49-Arg212) dat beschreven is in de literatuur (A. Göulas et al, Journal of Protein Chemistry, vol 15, no 1, 1-9, 1996). De lokaties waar het trypsin kan knippen zijn
- 40 immers bekend. Het is eveneens mogelijk het (Phos-h) te onderwerpen aan een polymeriseringsreactie met een glutaminase, teneinde een koppeling te realiseren aan het uiteinde (Gln49) van het (Gln49-Arg212) segment teneinde het moleculair gewicht nog te verhogen. Het is immers bekend dat

glutaminase amide-bindingen kan vormen (H. Ando et al, Agric. Biol. Chem., 53, (10), 2613-2617, 1989). Uit de beschikbare resultaten kan geconcludeerd worden dat ook deze produkten (Phos-h)n een betere competentie hebben dan het natuurlijk phosvitin.

Bij gebruik van fosfopeptiden als beschermende coating is het zinvol produkten te gebruiken met een relatief hoog moleculair gewicht. Het is eveneens zinvol peptidedelen met hydrofobe groepen te vermijden en te verwijderen. Het is zinvol om CPP te polymerizeren en om gedeeltelijk gehydrolyseerd phosvitin te gebruiken in plaats van phosvitin.

#### De Produkten: amino-polymeren

In een ander aspekt van de uitvinding is gebleken dat ook het amino-peptide Epsilon-polylysine een beschermende werking vertoont (PF van 3.6% e-polylysine :70). Ook hier weer blijkt het belang van een hoog moleculair gewicht. Een coating met Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethane; PF(3.4% tris): 35), levert bij gelijke molaire hoeveelheid amine-componenten een lagere PF-waarde dan polylysine. Epsilon-Polylysine biedt voordelen ten opzicht van de produkten die algemeen bekend zijn: het is veel groter dan arginine en de kleine (1-4) arginine-peptide en het is veiliger dan het gekende polyethyleenimine (PEI), waarvan de schadelijkheid bij inname bekend is. Het heeft de GRAS (Generally Recognized as Safe) status bekomen van de FDA en mag gebruikt worden in voedingsmiddelen maar is niet bekend als tandenbeschermend middel. Het kan ingezet worden in een concentratie van 1% tot 40%. Epsilon-polylysine kan geproduceerd worden bij middel van een bacterieel fermentatieproces. Als alternatief voor epsilon-polylysine kan gebruik gemaakt worden van andere aminopolymeren zoals protamine en gehydrolyseerd chitosan (het biedt het voordeel dat, bij een moleculair gewicht beneden de 25000 dalton, chitosan wateroplosbaar is bij neutrale en basische pH, hetgeen niet het geval is met hoog moleculair chitosan). Tegen meerkost kan men in principe ook synthetische polylysines (met elk molecuulgewicht) gebruiken of polymeren op basis van vinylformamide (waarvan de amide component omgezet kan worden in een amino-component door een zure of basische behandeling).

#### De produkten: Aminopolymeren met Calcium-complexerende componenten

Deze klasse van nieuwe polymeren is uniek in zoverre dat ze een hoge hechtkracht aan het tandoppervlak combineren met een sterke zuurneutralisatie competentie. Ze vertonen veelal zeer hoge beschermingsfactoren. De amino- en fosfaat-componenten bieden de ultieme combinatie van gewenste competenties: een goede hechting aan het

tandoppervlak via fosfaten of fosfonaten en een sterke zuurneutralisatie door een hoge lading aan basische componenten in één polymeer-struktuur.

- 5 In een ander aspekt van de uitvinding werd, verassenderwijze, gevonden dat een copolymeer van caseinfosfopeptide en epsilon-polylysine (PF van 7.8% (CPP-elys)<sub>n</sub> : 94) een betere bescherming biedt dan gepolymeriseerd caseinfosfopeptide (PF van 7.2% (CPP)<sub>n</sub> : 58). De polymerisatiereactie wordt uitgevoerd zoals bij gepolymeriseerd casein fosfopeptide waarbij een
- 10 deel van het CPP (1 tot 99 % en bij voorkeur 10 tot 30%) vervangen wordt door epsilon polylysine. Het (CPP-elys)<sub>n</sub> kan ingezet worden bij elke wateroplosbare concentratie of bij een concentratie van 0.01% tot 30% (en bij voorkeur tussen de 1 en 10%) in de eindformulering die gebruikt wordt voor de behandeling van het gebit. Het produkt kan ook ingezet worden in
- 15 formuleringen met fluoriden. Het effect van fluoride blijkt additief te zijn aan dat van (CPP-elys)<sub>n</sub>. 0.1% NaF en een mengsel van "3.6 % (CPP-elys)<sub>n</sub> + 0.1% Na fluoride" vertonen een PF-waarde van respectievelijk 61 en 100. Men kan epsilon-polylysine gebruiken met elk moleculair gewicht. In principe kan ook gebruik gemaakt worden van chitosan-hydrolysaten
- 20 (Mw < 30000 dalton; experiment 13 : 2.2% CPP-chitosan-hydrolysaat-copolymeer: PF-waarde: 63) die wateroplosbaar zijn in neutrale of basische omstandigheden. De reactieprocedure en omstandigheden (temperatuur, concentraties, pH) zijn gelijkaardig aan die voor CPP-epsilon-polylysine-copolymeren. Alvorens het polyamine toe te dienen aan het reactiemengsel
- 25 kan men het CPP en het carbodiimide tijdelijk (0.5 minuut tot meerdere uren) laten reageren. Men kan het eindprodukt gebruiken en de hardheidstest doen op ongezuiverd reactiemengsel of men kan eerst de laag moleculaire afvalstoffen verwijderen bij middel van gel permeatie chromatografie, ultrafiltratie of een andere zuiveringsmethode. Ook Protamine, een basisch
- 30 polypeptide (80-200 kdal), protamine hydrolysaten of synthetische polylysines (Mw 200 tot > 1.000.000) kunnen gebruikt worden als alternatief voor epsilon-polylysine.
- In een ander aspekt van de uitvinding werd gehydrolyseerd phosvitin (Phos-h)
- 35 gekoppeld met epsilon-polylysine tot (Phos-h x elys)<sub>n</sub>. De koppeling kan enzymatisch uitgevoerd worden met glutaminase of met een carbodiimide, of een combinatie van beiden.
- De pH is bij voorkeur boven 8 teneinde neerslag te vermijden. Dit produkt (Phos-h x elys)<sub>n</sub> kan ingezet worden bij een concentratie van 0.01% tot
- 40 30% in de eindformulering. De glutaminase reactie kan uitgevoerd worden bij een temperatuur van 15 tot 80°C, bij voorkeur 40 tot 60°C bij een enzymconcentratie van 0.1% tot 10% op proteingewichtsbasis.

In een ander aspect van de uitvinding, bleek verrassenderwijze dat bisgefosfonyleerd epsilon-polylysine (elys-bisfo)n een zeer hoge beschermfaktor heeft (PF van 3.5% polylysine-bisfosfonaat: 100). Bisfosfonaat-componenten zijn aan elkaar gekoppeld via slechts één (koolstof)atoom; daardoor zijn het sterke chelatoren. Afhankelijk van de koppelingsprocedure voor hechting van de bisfosfonyl-groep aan epsilon-polylysine, kan het tussenliggend koolstof-atoom desgevallend ook nog een hydroxyl-groep dragen, die ook een bijdrage levert aan de complexatie met het calcium-ion hetgeen een nog sterker chelerend gedrag inhoud. Het (elys-bisfo)n kan ingezet worden bij een concentratie van 0.01% tot 30% (en bij voorkeur tussen de 0.5 en 10%) in de eindformulering die gebruikt wordt voor de behandeling van het gebit. Het produkt kan gemaakt worden door een reactie van epsilon-polylysine met epoxy-ethane-difosfonate in water, alcoholen, vloeibare zouten of mengsels van water en alcohol (of andere wateroplosbare organische solventen: aceton, dioxaan...), bij een temperatuur van 20 tot 90°C (bij voorkeur 40 tot 60°C), met een molaire epsilon-polylysine/epoxy verhouding van 0.5 tot 10. De reactie kan uitgevoerd worden bij een pH van 3 tot 9, maar bij voorkeur tussen 4 en 7 (in dit aspect van de uitvinding blijkt dat koppeling in zuur milieu de beste PF-factoren leveren). Een lewis catalysator (eg BF<sub>3</sub>) kan gebruikt worden in een verhouding tot het epoxide van 0.005 tot 10% w/w. In een ander aspect van de uitvinding blijkt dat een groter aantal bisfosfonyl groepen op gedenatureerd polylysine kunnen gehecht worden dan op niet gedenatureerd polylysine (ref. produkt 24: 6.3 bisfosfonylgroepen per molecule). Indien de koppeling uitgevoerd wordt op gedenatureerd polylysine in plaats van de niet-gedenatureerde versie worden de hoogste PF waarden bekomen: (PF-faktor van 1.5% niet-gedenatureerd polylysine-bisfosfonaat no. 22 en van het overeenkomstige gedenatureerd produkt no. 24 zijn respectievelijk 70.4 en 88.9). Het urea kan in elke gewenste dosering gebruikt worden maar bij voorkeur toch voldoende hoog (niet uitsluitend maar bijvoorbeeld 8M) om een voldoende denaturering te voorzien. Het epoxide kan via een bekend proces (met betrekking tot de reactieomstandigheden wordt ter referentie verwezen naar patent US 3.940.436) gemaakt worden uit een zout van vinylidene difosfonate (of het zuur) en waterstofperoxide (of een andere peroxiderend produkt) desgevallend in aanwezigheid van een catalysator zoals natrium tungstaat.

In principe kan men de epoxidatiestap en de additie van de amine component gelijktijdig doorvoeren in één mengsel (produkt 17 en 18); als alternatief (produkt 19 tot 23) wordt de reactie in twee stappen uitgevoerd waarbij eerst de overmaat waterstofperoxide verwijderd wordt alvorens over te gaan tot de reactie van epoxide met epsilon-polylysine. De overmaat van

waterstofperoxide kan verwijderd worden door het neerslaan van het epoxide; bijvoorbeeld door toevoeging van aceton aan de wateroplossing. Beiden, de één- en de twee stappen reactieprocedure geven een verbetering in PF waarden tov epsilon-polylysine, maar de twee stappen procedure resulteert in hogere PF-waarden dan bij de 1-stap procedure. PF van 3.6% epsilon-polylysine (produkt 6): 73; PF van 3.5% epsilon-polylysine-bisfosfonate (produkt 17; 1 fazige procedure) : 82; PF van 3.5% epsilon-polylysine-bisfosfonate (produkt 20; 2-fazige procedure): 100.

Een andere produktieroute kan verlopen via een methylene difosfonaat ester dat met t-BuOK en tosylazide omgezet wordt tot een diazomethylene-difosfonate ester (voor de bereiding verwijzen we ter referentie naar US 4150223). De diazoverbinding kan met water omgezet worden in carbonyldifosfonate ester (US 6147245) en daarna reductief geamineerd worden met epsilon-polylysine en een reductief agens zoals natriumboorhydride.

In een ander aspekt van de uitvinding werd een nieuw produktieproces ontwikkeld voor gephosphonyleerd chitosan (produkt 25). Het is bekend dat chitosan een beschermende werking heeft maar ook het nadeel dat het niet wateroplosbaar is bij neutrale of basische pH. Het is dus moeilijk inzetbaar in eindformuleringen. Het is bekend dat chitosan oplosbaar kan gemaakt worden in neutrale en basische omstandigheden door er carboxyl groepen op te plaatsen. Het is gebruikelijk hiervoor chloor-azijnzuur te gebruiken ( $\text{ClCH}_2\text{COOH}$ ); de fosfonylering is evenwel moeilijker te realiseren. Men kan het overeenkomstige  $\text{ClCH}_2\text{PO}_3\text{H}$  gebruiken, maar dit produkt is minder actief en veroorzaakt degradatie in de saccharideketen met ernstig viscositeits verlies ten gevolge zonder dat de oplossing volledig helder wordt. We hebben verrassenderwijze gevonden dat het mogelijk is chitosan te fosfonyleren zonder substantiele afbraak van de polymeerketen en de viscositeit met een gefosfonyleerd epoxide, fosfomycin genaamd (1,2-epoxypropylfosfonic acid;  $\text{R}_1$ :methyl,  $\text{R}_2, \text{R}_3$ :H); dit produkt kan oa bekomen worden door fermentatie met streptomyces fradiae. De reaktietemperatuur is tussen 50 en 100 °C (bij voorkeur rond 80°C) en de minimum reaktietijd belooft 20 tot 40h. De pH is >7. De oorspronkelijk onoplosbare massa verandert geleidelijk aan in een kleurloze, heldere, visceuze massa. Het produkt is goed oplosbaar in water bij neutrale en basische pH en visceus. De reactie kan uitgevoerd worden in water maar er wordt een beter resultaat geboekt door een water/alcohol (vb methanol, ethanol, isopropanol...) mengsel te gebruiken. Het is eveneens aan te bevelen om het chitosan vooraf te activeren door het op te lossen met een zuur (bijvoorbeeld azijnzuur), te dispergeren door toevoeging van een

alcohol (vb. isopropanol) , neer te slaan met een base (NaOH) en dan te onderwerpen aan een vries/smelt behandeling. Deze maatregelen zijn noodzakelijk voor het inkorten van de reaktietijd en het behoud van een goede viscositeit en hoge helderheid bij het eindresultaat.

In een ander aspect van de uitvinding bleek dat gehydroxyphthaliseerd epsilon-polylysine (produkt 27)(plys-hphth) eveneens een goede beschermende werking heeft (PF van 3.6% elys-hphth: 90.7), en superieur is aan epsilon-polylysine; het is bekend dat ook hydroxyphthalaten in staat zijn om calcium te cheleren. (elys-hphth) kan gemaakt worden in DMSO, water, of water/alcohol mengsels; de ratio 3-hydroxyphthalic anhydride / polylysine is 0.05 tot 1; het anhydride wordt bij voorkeur toegevoegd bij 0-6 °C waarna de reactie overnacht doorgaat bij 20°C. Het (elys-hphth) kan ingezet worden bij een concentratie van 0.01% tot 30% (en bij voorkeur tussen de 0.5 en 10%) in de eindformulering die gebruikt wordt voor de behandeling van het gebit. Het is oplosbaar in water bij pH >9.

Epsilon-polylysine, dat behoort tot de klasse van aminopeptiden en dat nuttig is voor de bescherming van tanden als dusdanig of na modificatie (bijvoorbeeld na conjugatie met fosfopeptiden, bisfosfonylering of na phthalisering), is niet het enige polyamine dat kan gebruikt worden. Uit de resultaten kan geconcludeerd worden dat ook synthetisch polylysine en ook proteïnen en peptiden die niet exclusief (voor 100%) maar slechts voor een belangrijk gedeelte (minstens 40% van de totale hoeveelheid aminozuren) bestaan uit lysine aminozuren, tanden kunnen beschermen, als dusdanig maar ook na een gelijkaardige modificatie (bisfosfonylering....) die plaatsgrijpt op het stikstof atoom. Uit de resultaten kan geconcludeerd worden dat de produkten groter dienen te zijn dan de produkten uit de prior art (CPP, arginine, kleine arginine peptiden (2-4 aminozuren), en dat het moleculair gewicht bij voorkeur hoger is dan 2.5kdal.

Produkten die in de context van dit document beschreven zijn als peptiden kunnen ook gedefinieerd worden als proteïnen en omgekeerd. Het lysine aminozuur in de peptiden&proteïnen kan ook vervangen worden door andere basische aminozuren zoals arginine (bij voorbeeld protamine) of ornithine. Uit de resultaten van produkten 13,14 en 15 kan ook geconcludeerd worden dat het epsilon-polylysine kan vervangen worden door gedeeltelijk gehydrolyseerd chitosan (dat wateroplosbaar is bij neutrale of basische pH) voor gebruik als dusdanig of na chemische modificatie (bijvoorbeeld bisfosfonylering of conjugatie met fosfopeptiden). Chitosan met een moleculair gewicht beneden de 30kdal zijn wateroplosbaar in neutraal of basisch milieu.

- 5 Met betrekking tot de klasse van fosfopeptiden, kan het partieel gehydrolyseerd phosvitin (Phos-h), dat kan geconjugeerd worden met epsilon-polylysine (bijvoorbeeld produkt 16) of dat kan gepolymeriseerd worden met glutaminase, vervangen worden door het natuurlijk phosvitin in deze reacties.

Anti-microbiele activiteit van e-polylysine en gemodificeerd e-polylysine.  
Bijlage 5 tot en met 9.

- 10 In een ander aspekt van de uitvinding bleek dat epsilon-polylysine, bisgefosfonyleerd epsilon-polylysine (elys-bisfo), e-polylysine-hydroxyphthalaat en het copolymeer van caseinfosfopeptide en epsilon-polylysine (CPP x elys)n anti-microbiele activiteit vertonen tegen organismen uit het mondbed. Er werden meer dan honderd anaerobe-,  
15 aerobe-, microaerophilische bacterien en schimmels getest die allen uit het mondbed geoogst zijn.  
Epsilon-polylysine vertoont de meeste activiteit tegen alle soorten organismen met een opmerkelijk hoge activiteit tegen schimmels.  
De activiteit van het gebisfosfonyleerd epsilon-polylysine tegen  
20 streptococcus is ook opmerkelijk.  
Alhoewel deze produkten hun beschermkracht tegen zuren in de eerste plaats ontleen aan de competentie om zuren te neutralizeren, en alhoewel hun beschermkracht gemeten volgens het in-vitro model niet kan veroorzaakt worden door hun anti-microbiele activiteit, zou de anti-  
25 microbiele activiteit onder in-vivo omstandigheden toch kunnen bijdragen tot de beschermcompetentie van de produkten. Dit is onder andere ook relevant voor epsilon-polylysine dat, omwille van deze ontdekking, de activiteit tegen schimmels en andere organismen, ook ingezet kan worden als anti-microbieel ingrediënt in artificieel speeksel. Xerostomia-, kanker-  
30 en Hodgkin's patienten worden immers regelmatig geconfronteerd met schimmelinfecties in het mondbed.

In-vivo testen.

- 35 De testen onder in vitro-omstandigheden (op tandmonsters buiten het mondbed) worden vervolledigd met testen in het mondbed (in-vivo), bij een serie proefpersonen, teneinde de natuurlijke omstandigheden na te bootsen.  
Hiertoe worden mondstukken gemaakt (naar de vorm van de achterkant van het gebit) waarin vier tot zes experimentele tandmonsters kunnen geplaatst;  
40 het geheel kan in de mond gepositioneerd worden vlak achter de onderste rij tanden. Het is bekend dat de hardheid van het oppervlak van verse gezuiverde tandmonsters met enkele  $\mu\text{m}$  daalt (gemeten volgens de Knoop methode) nadat ze een aantal dagen aanwezig zijn in het mondbed. Dit is



het werk van de orale microflora die na een aantal dagen een schadelijke werking begint uit te oefenen op de tanden. We hebben nagegaan in welke mate deze hardheidsdaling kan vermeden worden door het voorafgaandelijk

5 behandelen van een tandmonster met een druppel van een experimenteel produkt. Teneinde het langere termijn effect van de zuurproduktie van de bacterien te simuleren, werden de tandmonsters die behandeld geweest zijn met een experimenteel produkt, na verblijf van één of meerdere dagen in het

10 mondgebied, verwijderd uit de mond en onder laboratoriumomstandigheden behandeld met een zuur (azijnzuur, melkzuur), teneinde de residuele beschermkracht van het experimenteel produkt na verblijf in de mond en ten opzichte van de blanco (tand zonder experimenteel produkt) te kunnen vaststellen. Hierbij worden meerdere experimenten uitgevoerd en worden

15 diverse parameters gevarieerd. Naast de evaluatie van verschillende experimentele produkten (gebisfosfonyleerd epsilon-polylysine, caseinfosfopeptide-epsilon-polylysine conjugaat,...), worden ook de tijdsduur van aanwezigheid in de mond (bijvoorbeeld één of vijf dagen), de methode voor plaatsing van het experimenteel produkt op het tandoppervlak (bijvoorbeeld door het aanbrengen van een druppel produktoplossing op het

20 tandoppervlak buiten het mondgebied met onmiddellijke verwijdering van de druppel na een korte inweekperiode of door spoeling van zuivere tandmonsters in het mondgebied met een spoelwater dat het produkt bevat). Ook de frekwentie van toediening van het produkt kan gevarieerd worden (bijvoorbeeld van éénmaal per vijf dagen tot enkele malen per dag). Er

25 wordt gebruik gemaakt van twee soorten mondstukken; ééntje waarbij een gaas is aangebracht dat geplaatst is vlak voor de tandmonsters (voor experimenten van langere duur) om de bacterien de kans te geven zich sneller te koloniseren in de nabijheid van het tandoppervlak, en een ander mondstuk zonder metaalgaas voor de experimenten van kortere duur. Er

30 worden eveneens experimenten uitgevoerd met tandmonsters die behandeld geweest zijn met fluoride oplossingen en met blanco's teneinde de resultaten ervan te kunnen vergelijken met deze van de tandmonsters die met een experimenteel produkt behandeld geweest zijn. Per experiment wordt gebruik gemaakt van meerdere tandmonsters (veelal meer dan

35 twintig) en de resultaten worden statistisch geevalueerd; sommige tandmonsters worden voorafgaandelijk behandeld met de bestraling die gebruikt wordt bij patienten met mond- en keelkanker teneinde de beschermkracht van de experimentele produkten voor het gebit van deze

40 klasse patienten te kunnen evalueren; de bestraling zelf kan immers ook een effect genereren op de tand; zie Methoden en Materialen.

Andere ingrediënten in eindformuleringen

De nieuwe tandbeschermende polymeren kunnen gebruikt worden in gekende eindformuleringen van diverse aard voor mondhygienische toepassingen: tandpasta, mondverfrissende oplossing, mondspoelmiddel, mondspray, gelen, kauwgum, candies en andere voedingsmiddelen, 5  
artificieel speeksel, medische produkten voor de behandeling van het gebit van patienten met mondkanker, hodgkin's ziekte, syndroom van Sjogren, xerostomia. Een overzicht over de ingrediënten van deze eindformuleringen 10  
wordt vermeld in US 6.238.648, dat ter referentie bijgevoegd wordt.

De eindformuleringen kunnen ook andere componenten bevatten voor bescherming tegen caries: fluoriden (US 2.946.725 en US 3.678.154; bijvoorbeeld fluoride zouten van alkali metalen of tin zoals natrium 15  
fluoride, natrium monofluorofosfaat of tin fluoride of ingecapselde fluoride derivaten (ter bescherming tegen de-activerende componenten zoals calcium of orthofosfaten). Fluoride componenten worden gebruikt in een concentratie van ongeveer 0.1 tot 1% w/w en bij voorkeur tussen 0.25 en 0.5 20  
% op gewichtsbasis. De eindformulering kan ook andere beschermende middelen bevatten zoals vermeld onder het hoofdstuk "Stand der techniek", waaronder ingrediënten met antibactericide werking (kapitel 1. natuurlijke bactericiden, synthetische bactericiden, plant extracten, peptiden met immunologische aktiviteit en anti-lichamen tegen S. mutans, 25  
bacteriophagen), suikers ter belemmering van de zuurproductie (Kapitel 2.: xylitol, erythritol), enzymen (Kapitel 3.: eg. glucanases en dextranases) en een vaccin tegen glucosyltransferase of peptiden analoog aan S. mutans antigen I/II, ingrediënten voor herstelwerk aan appatiet (Kapittel 4. calcium, 30  
phosphaten, casein, niet-gedenatureerd casein, casein hydrolysaten (CPP), zuurabsorberende coatings en zuur neutraliserende moleculen zoals chitosan, polyethyleenimine fluorofosfaat, arginine en arginine peptiden(2-4).

Sommige ingrediënten (bv Calcium zouten) kunnen ingecapseld worden met een micel-vormende stof of een waterafwerende coating, om 35  
interferentie met fluoride tijdens de bewaarperiode te vermijden. Er kan gebruik gemaakt worden van calcium chloride, calcium acetaat, calcium butylaat, calcium citraat, calcium lactaat, calcium salicylaat, of een ander niet-toxisch anorganisch of organisch calcium zout bij een concentratie van 0.1% tot 5% w/w.

40  
De eindformulering kan ook tensioactieve stoffen bevatten waaronder nietionische, anionische, amfotere, cationische, zwitterionische en

synthetische detergenten beschreven in diverse patenten: US 3.988.433, US 4.051.234, US 3.959.458.

- 5 Nietionische detergenten zijn condensaten van hydrofiele alkylene oxide groepen met hydrofobe organische componenten. Voorbeelden van nietionische zijn: poloxamers (verkocht onder de naam Pluronic), polyoxyethylene sorbitan esters ("Tween"), polyethylene oxide condensaten van alkyl phenolen, condensaten van ethylene oxide met reactieprodukten van propylene oxide en ethyleen diamine, ethylene oxide condensaten van
- 10 aliphatische alcoholen, tertiary amine oxides met keten, tertiary fosfine oxide met keten, dialkylsulfoxides met keten en mengsels. Amphotere detergenten zijn alifatische secondaire en tertiaire amines waarbij de alifatische component een rechte of vertakte keten is met aanwezigheid van een anionische groep (eg .carboxylaar, sulfonaat, sulfaat, fosfaat, fosfonaat).
- 15 Anionische detergenten zijn zouten van alkylsulfaten met 8 tot 20 koolstofatomen (bijvoorbeeld natrium alkyl sulfaat) en zouten van gesulfoneerde monoglyceriden van vetzuren met 8 tot 20 koolstofatomen. Enkele voorbeelden: natrium lauryl sulfaat en natrium kokosnoot
- 20 monoglyceride sulfonaat, sarcosinaten zoals natrium lauroyl sarcosinaat, natrium lauryl sulfoacetaat, natrium lauroyl isethionaat, natrium laureth carboxylaar, natrium dodecyl benzenesulfonaat of mengsels. Meestal wordt een hoeveelheid anionisch detergent ingezet van 0.025% tot 9% en bij voorkeur 0.1% tot 5% w/w.
- 25 Verdikkingsstoffen worden gebruikt in eindformuleringen om een geschikt rheologisch profiel te bekomen: guar gum, carboxyvinyl polymeren, carageenan, carboxymethylcellulose, polyoxyethylene polyoxypropylene glycol copolymeren, gum karaya, gum arabic, gum tragacanth en xanthan
- 30 gum worden gebruikt in een concentratie van 0.1% tot 15% . Carbopol van BF Goodrich, gecrosslinkte polymeren van acrylzuur zijn gekend in de sektor.
- 35 De eindformulering kan ook een bevochtiger bevatten. Het betreft hier bijvoorbeeld polyalcoholen die beletten dat de formulering hard wordt bij luchtkontakt en die een zacht vochtig mondgevoel bieden. Meer specifiek gaat het over glycerin, sorbitol, butylene glycol, polyethylene glycol, sorbitol.
- 40 De eindformulering kan ook schuurmiddelen bevatten die algemeen bekend zijn voor deze toepassing: silica zoals amorphous gehydrateerd silica, natrium methafosfaat, kalium metafosfaat, tri-calcium fosfaat, calcium fosfaat twee-hydraat, calcium fosfaat, calcium pyrofosfaat, natrium bicarbonaat, calcium bicarbonaat, hydrated alumina.

- Soms gebruikt men polymeren als schuurmiddel (US 3.070.510): melamines, polyphenolen, melamine, ureas, urea-formaldehyde....; Silica schuurmiddelen worden beschreven in US 3.538.230 en US 3.862.307 (ter referentie bijgevoegd). "Syloid" (van W.R. Grace & Company) en "Zeodent" van (J.M. Huber corporation) zijn bekende namen. Meestal bevatten tandpasta 10% tot 70% schuurmiddel. Er kan ook een mengsel van schuurmiddelen gebruikt worden.
- 5
- 10 De eindformulering kan ook anti-tandsteen ingredienten bevatten zoals pyrofosfaat zouten zoals Na.sub.4 P.sub.2 O.sub.7, K.sub.4 P.sub.2 O.sub.7, Na.sub.4 K.sub.2 P.sub.2 O.sub.7, Na.sub.4 H.sub.2 P.sub.2 O.sub.7 and K.sub.2 H.sub.2 P.sub.2 O.sub.7, natrium hexamethafosfaat, natrium tripolyfosfaat en cyclische fosfaten zoals natrium trimethafosfaat.
- 15 De gebruiksdosering is rond 0.5 tot 10% w/w. Desgevallend kunnen anionische polycarboxylaten of gecarboxyleerd chitosan gebruikt worden om het anti-tartar effect te versterken. Copolymeren van maleinezuur (anhydride) met andere ethylenische monomeren zoals methylvinyl-ether/maleinezuur anhydride met een moleculair gewicht van 30.000 tot
- 20 1.000.000 en bij voorkeur tussen 30.000 en 500.000 zijn gekend onder de naam Gantrez. De gebruikelijke concentratie is tussen 0.5% en 5%. Andere mogelijkheden zijn zinc citraat trihydrate, polyfosfaten, difosfonaten (EHDP) en polypeptiden.
- 25 De eindformulering kan ook smaakstoffen bevatten, meestal bij een concentratie tussen 0.1% en 5% en bij voorkeur tussen 0.5% en 1.5% w/w. Voorbeelden van beschikbare olien zijn: spearmunt, peppermunt, menthol, anethole, methyl salicylaat, cassia, 1-menthyl acetaat, eugenol, parsley oil, oxanone, alpha-irisone, marjoram, propenyl guaethol, vanillin, thymol,
- 30 linalool, cinnamaldehyde glycerol acetal, wintergreen, sassafras clove, sage, eucalyptus, marjoram, cinnamon, lemon, lime, grapefruit, orange.
- De eindformulering kan ook zoetstoffen bevatten; naast de bekende anticariogene zoetstoffen zijn ook de volgende produkten nuttig: subroxe,
- 35 glucose, saccharin, dextrose, levulose, lactose, mannitol, sorbitol, fructose, maltose, xylitol, saccharin zouten, thaumatin, aspartame, D-typhophan, dihydrochalconen, acesulfame en cyclamate zouten, natrium saccharin.
- De eindformulering kan ook ingredienten bevatten tegen overgevoeligheid
- 40 (bij voorbeeld kalium nitraat of kalium citraat), wittende produkten (bijvoorbeeld waterstof peroxide, calcium peroxide, urea peroxide), conserveringsmiddelen, een koelend agens (eg. carboxamides, menthol, ketals), anti-inflammatoire ingredienten (aspirin, ibuprofen, naproxen...).

De eindformulering kan ook bewaarmiddelen bevatten.

- 5 De formulering kunnen aangeboden worden in één of twee fazen; bij twee-fazige formulering bevinden de ingredienten zich in twee afzonderlijke compartimenten en ze worden vlak voor gebruik gemengd, bij middel van co-extrusie.
- 10 De compositie van de diverse eindformuleringen is welbekend en wordt ter referentie bijgevoegd: voor tandpasta's en gelen bijvoorbeeld US3988433, voor mondspoelmiddelen bij voorbeeld US3988433, voor candies bijvoorbeeld US 4.083.955, voor kauwgom bijvoorbeeld US 4.083.955 en voor subgingivale behandeling bijvoorbeeld US 5.198.220.
- 15 Tandpasta's en gelen bevatten veelal een schuurmiddel (10% tot 50%), een detergent (0.5% tot 10%), een verdikkingsmiddel (0.1% tot 5%), een bevochtiger (10% tot 55%), een smaakstof (0.04% tot 2%), een zoetstof (0.1% tot 3%), een kleurstof (0.01% tot 0.5%), , water (2% tot 45%), en eventueel een anticariogeen produkt (0.05% tot 10%) of een anti-tartar
- 20 produkt (0.1% tot 13%)
- Mondspoelmiddelen en sprays bevatten veelal de volgende produkten: water (45% tot 95%), ethanol (0% tot 25%), een bevochtiger (0% tot 50%), een tensio-aktieve stof (0.01% tot 7%), een smaakstof (0.04% tot 2%), een
- 25 zoetstof (0.1% tot 3%) en een kleurstof (0.001% tot 0.5%) en desgevallend een anticariogeen produkt (fluoride ; 0.05% tot 0.3%) en een anticalculus agens( 0.1% tot 3%).
- 30 Een andere formulering betreft niet abrasieve gelen (subgingivale gelen). Ze bevatten een verdikkingsmiddel (0.1% tot 20%), een bevochtiger (0.1% tot 90%), een smaakstof (0.04% tot 2%), een zoetstof (0.1% tot 3%), een kleurstof (0.01% tot 0.5%), water (2% tot 45%) en een anticariogeen of anti-calculus produkt.
- 35 Kauwgom formuleringen bevatten meestal een gom (50% tot 99%), een smaakstof (0.4% tot 2%) en een zoetstof (0.01% tot 20%), en kan desgevallend ook een anticariogeen produkt bevatten.
- Candies, muntjes, capsules, tabletten, en dergelijke voedingsvehikels zijn beschreven in devolgende patenten: US 4.642.903, US 4.946684, US 4.305.502, US 4.371.516, US 5.188.825, US 5.215.756, US 5.298.261, US
- 40 3.882.228, US 4.687.662, US 4.642.903.

Conclusies

Wij claimen,

- 5 1. De volgende nieuwe gemodificeerde peptiden en glycopeptiden die  
gekenmerkt zijn door de aanwezigheid van meerdere fosfaat- of  
fosfonaatgroepen, of de aanwezigheid van een mengsel van fosfaat- en  
amino groepen, of van een mengsel van fosfonaat- en amino groepen:  
10 met name, bisgefوسفonyleerd-epsilon-polylysine (elys-bisfo),  
caseinfosopeptide dat gepolymeriseerd werd door een carbodiimide tot  
(CPP)n, phosvitin dat gehydrolyseerd werd met trypsin of met pepsin of met  
een combinatie van beide enzymen tot ( Phos-h), caseinfosopeptide dat  
geconjugerd werd met epsilon-polylysine of met gehydrolyseerd chitosan  
15 door een carbodiimide tot respectievelijk (CPP x elys)n en (CPP x hy-chit)n,  
gehydrolyseerd phosvitin ( Phos-h) dat gepolymeriseerd werd tot (Phos-h)n  
of dat geconjugerd werd met epsilon-polylysine of met gehydrolyseerd  
chitosan door een carbodiimide en/of glutaminase tot respectievelijk ( Phos-  
h x elys)n en ( Phos-h x hy-chit)n.
- 20 2. De volgende nieuwe gemodificeerde sacchariden die gekenmerkt zijn  
door aanwezigheid van een mengsel van meerdere fosfonaat- en  
aminogroepen: met name bisgefوسفonyleerd-chitosan-hydrolysaat (hy-chit-  
bisfo) en chitosan dat gefوسفonyleerd werd met fosfomycin tot  
gefوسفonyleerd chitosan (chit-fos).
- 25 3. Het gebruik van Aminoproteinen, van Chemisch gemodificeerde amino-  
en phosphoproteinen, van Gemodificeerd chitosan, of het gebruik van een  
mengsel van één of meerdere hiervan, in producten voor tand- en  
mondverzorging,
- 30 a) waarbij de term, Amino-proteinen, verwijst naar epsilon-polylysine  
(elys), synthetisch polylysine, en proteïnen waarvan de aminozuren voor  
minstens 40% bestaan uit lysine en met een molecuulgewicht van minstens  
2kda.
- 35 b) en waarbij de term, Chemisch gemodificeerde amino-proteinen,  
verwijst naar bisgefوسفonyleerd epsilon-polylysine (elys-bisfo), epsilon-  
polylysine-3-hydroxyphthalaat en bisgefوسفonyleerde proteïnen met  
minstens 40% lysine-aminozuren en met een molecuulgewicht van  
40 minstens 2kda.
- c) en waarbij de term, Chemisch gemodificeerde fosfoproteinen,

- verwijst naar gepolymeriseerd caseinfosfopeptide (CPP)<sub>n</sub> , partieel gehydrolyseerd phosvitin (Phos-h) en met glutaminase gepolymeriseerd phosvitin-hydrolysaat (Phos-h)<sub>n</sub>, caseinfosfopeptide-epsilon-polylysine-copolymeer (CPP x elys)<sub>n</sub> , caseinfosfopeptide-gehydrolyseerd-chitosan-copolymeer (CPP x hy-chit)<sub>n</sub> , en copolymeren van gehydrolyseerd phosvitin (Phos-h) of phosvitin (Phos) met epsilon-polylysine of met gehydrolyseerd chitosan tot respectievelijk (Phos-h x elys)<sub>n</sub> , (Phos-h x hy-chit)<sub>n</sub>, (Phos x elys)<sub>n</sub> en (Phos x hy-chit)<sub>n</sub>,
- d. en waarbij de term, Gemodificeerd chitosan, verwijst naar gehydrolyseerd chitosan (hy-chit), bisgefosfonyleerd-gehydrolyseerd-chitosan (hi-chit-bisfo) en gefosfonyleerd chitosan (chit-fos).
4. Het gebruik van Epsilon-polylysine en van synthetisch polylysine volgens conclusie 3. met gelijk welk moleculair gewicht en waarbij de term Aminoproteinen volgens conclusie 3. zowel verwijst naar proteïnen als naar de overeenkomstig kleinere aminopeptiden.
5. Het gebruik van een Phosvitin hydrolysaat (Phos-h) volgens conclusie 3. dat bekomen wordt door behandeling met een protease.
6. Het gebruik van een Phosvitin hydrolysaat (Phos-h) volgens conclusie 5. dat bekomen wordt door hydrolyse van Phosvitin met trypsin, of chymotrypsin, of pepsin, of met een combinatie van één of meerdere hiervan.
7. Het gebruik volgens conclusie 3. van bisgefosfonyleerd epsilon-polylysine waarbij de term verwijst naar 2-polylysine-1-hydroxyethaan-1,1-difosfaat (produkt 22), en waarbij het aantal bisfosfonyl groepen per polylysine molecuul kan variëren tussen één en het aantal aanwezige amine-groepen.
8. Het gebruik volgens conclusie 3. van gehydrolyseerd chitosan met een moleculair gewicht lager dan 30000, en dat kan bekomen worden door enzymatische of zuur hydrolyse van chitosan.
9. Het gebruik van gefosfonyleerd chitosan volgens conclusie 3. en dat bekomen wordt uit de reactie tussen chitosan (met om het even welk molecuulgewicht) en 1,2-epoxypropylfosfonic acid (fosfomycin).

- 5 10. De procedure voor het maken van gepolymeriseerd casein fosfopeptide (CPP)<sub>n</sub>, uit een reactie in water tussen casein fosfopeptide en een wateroplosbaar carbodiimide.
11. De procedure volgens conclusie 10. waarbij het volgende carbodiimide wordt gebruikt: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide.
- 10 12. De procedure voor het maken van "casein fosfopeptide x epsilon-polylysine" co-polymeer (CPP x elys)<sub>n</sub> in water, uitgaande van casein fosfopeptide, epsilon-polylysine en een wateroplosbaar carbodiimide.
- 15 13. De procedure volgens conclusie 12. waarbij het volgende carbodiimide wordt gebruikt: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide.
- 20 14. De procedure voor het maken van Casein fosfopeptide x gehydrolyseerd chitosan co-polymeer (CPP x hi-chit)<sub>n</sub> in water, uitgaande van casein fosfopeptide, gehydrolyseerd chitosan (wateroplosbaar bij neutrale en basische pH) met moleculair gewicht lager dan 30000, en een wateroplosbaar carbodiimide.
- 25 15. De procedure volgens conclusie 14. waarbij het volgende carbodiimide wordt gebruikt: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide.
- 30 16. De procedure voor het maken van een copolymeer van gehydrolyseerd phosvitin en epsilon-polylysine (Phos-h x elys)<sub>n</sub>, waarbij het Phosvitin gehydrolyseerd werd met pepsin, trypsin, chymotrypsin (of een combinatie ervan), en de polymerisatiereactie uitgevoerd wordt met een wateroplosbaar carbodiimide (zoals 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide) en/of met het glutaminase enzym.
- 35 17. De procedure voor het maken van bisgefosfonyleerd epsilon-polylysine uitgaande van een mengsel van waterstofperoxide, epsilon-polylysine en vinylidene difosfonaat.
- 40 18. De procedure voor het maken van bisgefosfonyleerd epsilon-polylysine uitgaande van epsilon polylysine en een bisgefosfonyleerd epoxide bij een pH van 3 tot 9.



- 5 19. De procedure voor het maken van bisgefosfonyleerd epsilon-polylysine volgens conclusie 18, waarbij de epoxide component gekoppeld is aan een waterstofatoom of een alkyl groep en waarbij de fosfonylgroepen aanwezig zijn in de zure vorm (H), of een zout-vorm (Na, K, of andere) of veresterd zijn.
- 10 20. De procedure voor het maken van bisgefosfonyleerd epsilon-polylysine volgens conclusie 18. en uitgaande van epsilon polylysine en epoxyethaan-1,1-difosfonaat.
- 15 21. De procedure voor het maken van bisgefosfonyleerd epsilon-polylysine volgens conclusie 18. bij een pH van 3 tot 6 met een BF3 katalysator.
- 20 22. De procedure voor het maken van bisgefosfonyleerd epsilon-polylysine volgens conclusie 18. in een water/alcohol mengsel.
- 20 23. De procedure voor het maken van bisgefosfonyleerd epsilon-polylysine volgens conclusie 22. waarbij als alcohol het volgende produkt wordt ingezet: methanol, ethanol, isopropanol, butanol.
- 25 24. De procedure voor het maken van bisgefosfonyleerd epsilon-polylysine uitgaande van epsilon polylysine, een bisgefosfonyleerd epoxide en een denaturerend produkt zoals urea, bij een pH van 3 tot 9.
- 30 25. De procedure voor de produktie van gefosfonyleerd chitosan uit de reactie van chitosan van om het even welk moleculair gewicht en 1,2-epoxypropyl fosfonic acid (fosfomycin).
- 30 26. De procedure voor de produktie van gefosfonyleerd chitosan uit de reactie van chitosan en 1,2-epoxypropyl fosfonic acid (fosfomycin) in een mengsel van water en een alcohol zoals methanol, ethanol, isopropanol, butanol.
- 35 27. De procedure voor de produktie van gephtaliseerd epsilon-polylysine uit epsilon-polylysine en 3-hydroxyphthalic anhydride.
- 40 28. Het gebruik van de produkten die vermeld staan in de conclusies 1 tot en met 9 als ingredient (of combinatie van ingredienten) in produkten voor mondhygienische verzorging: tandpasta, mondverfrissende oplossing, mondspray en gelen, kauwgom, candies en andere voedingsmiddelen, artificieel speeksel, medische produkten voor behandeling van het gebit bij patienten met oa mondkanker, hodgkin's ziekte, xerostomia.

5 29. Het gebruik van de produkten die vermeld staan in de conclusies 1 tot en met 9, in de eindprodukten volgens conclusie 28., tezamen met algemeen gekende ingrediënten, waarvan sommige ook vermeld zijn in dit patent zoals:

10 andere anticariogene produkten (fluoride, antio-cariogene suikers, peptiden voor remineralisatie, produkten met anti-bacteriele competentie, vaccins, antilichamen, zuur absorberende produkten, ingecapselde ingrediënten, verdikkingsmiddelen, tensio-actieve stoffen (anionisch, nonionisch, cationisch, amphoteer..), bevochtigers, schuurmiddelen, anti-tandsteen middelen, smaakstoffen, bewaarmiddelen, koelende stoffen, anti-overgevoeligheidsstoffen, zoetstoffen.

15

20

25

30

35

40

### Methoden & Materialen

- 5 Producten. Casein fosfopeptiden (CPP, Mw 1 – 2 kdal), phosvitin, Tris(hydroxymethyl)-aminoethane (Trizma), vinylidene bisfosfonaat, chitosan, gehydrolyseerde chitosanen (Mw: 2000 tot 30000), 3-hydroxyphthalic anhydride, 1-(3-(dimethylamino)propyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride), Fosmomycin, natrium fluoride, epsilon-polylysine (Mw 4100 dalton), gecarboxyleerd chitosan, trypsin, zijn  
10 beschikbaar op de markt.  
Phosvitin hydrolysatens met een moleculaire massa van 1-3 kdal (PPP) kunnen bekomen worden na partiële basische defosforylatie gevolgd door enzymatische hydrolyse met trypsine (B. Jiang et al., J. Agric. Food Chem 2000,48, 990-994).
- 15 De beschermkracht (PF-waarde) wordt gemeten volgens de methode van Knoop. Er worden tandmonsters ter grootte van 3x3x3 mm gesneden uit tanden van menselijke oorsprong, zo ingebed in een groter blokje kunsthars dat het tandoppervlak ter voorschijn komt uit het oppervlak van het blokje.  
20 Het tandoppervlak wordt mechanisch gepolijst met roterend silicon carbide schuurpapier (Struers P1200-P2400-P4000) en de mikrohardheid van zuiver glazuur wordt gemeten met een Knoop diamanten naald (Leitz-Wetzlar; microdurometer "Durimet"; gewicht 50gr; penetratietijd: 30 seconden  
25 (Collys et al., J Dent Res 1990; 69: 458-462)). De penetratie laat een afdruk na, waarvan de lengte in  $\mu\text{m}$  een maat is voor de diepte van de penetratie. Gave gezonde tanden geven een indruk van 40 a 42  $\mu\text{m}$ . De penetratiediepte wordt zesmaal gemeten op elk tandmonster, waaruit een gemiddelde waarde wordt bepaald. Voor het meten van de invloed van zuur op de hardheid van  
30 het tandoppervlak wordt gebruik gemaakt van een azijnzuurbuffer van Merck (pH 5; 0.1 N azijnzuur). Een druppel zuur wordt geplaatst op het zuivere gladde oppervlak van het tandmonster voor een periode van 30 minuten bij 37°C. Daarna wordt het monster goed gespoeld met gedemineraliseerd water en gedroogd. De hardheid wordt opnieuw gemeten  
35 volgens de Knoop methode. Deze procedure wordt herhaald (in totaal 4 maal), hetgeen betekent dat het monster over een periode van 2 uren behandeld geweest is met zuur. Aan de hand van 5 gemiddelden (van telkens zes metingen; ééntje voor behandeling en ééntje telkens na elke  
40 behandeling met zuur) wordt een grafiek gemaakt. Op basis hiervan wordt een logaritmische regressielijn berekend.  
Na behandeling met zuur wordt een indruklengte bekomen van ongeveer 95  $\mu\text{m}$ .

- Bij het evalueren van de individuele beschermkracht van een experimentele coating, wordt de volgende procedure gebruikt: een tandmonster wordt eerst behandeld met een druppel experimentele coating (39°C, 30 minuten); de
- 5 behandeling wordt nog één keer herhaald, waarna de druppel verwijderd wordt met perslucht en daarna wordt het tandoppervlak geboend met een zachte papieren doek tot er geen zichtbare sporen meer zijn van het polymeer. Het tandmonster wordt nu 30 minuten ondergedompeld in
- 10 natuurlijk speeksel teneinde de mondomstandigheden na te bootsen. Daarna wordt de tand gedroogd en behandeld met een druppel zuur (39°C, 30 minuten). Het zuur wordt weggewassen, de tand wordt gedroogd en de hardheid wordt gemeten (zes metingen per keer). Deze procedure (coating/coating/ speeksel/zuur) wordt vier malen na elkaar uitgevoerd waarbij het glazuur geleidelijk aan zachter wordt. Aan de hand van de
- 15 dertig metingen wordt een grafiek, en een logaritmische regressielijn opgesteld die wordt vergeleken met de regressielijn van het tandmonster dat alleen maar met het zuur behandeld geworden is. Het verschil in penetratiediepte bij de start en na de viervoudige behandeling wordt gemeten (=delta P in  $\mu\text{m}$ ).
- 20 Op dezelfde wijze wordt de verandering in penetratiediepte gemeten bij een tandmonster dat alleen maar met zuur behandeld geweest is (= delta Pa). De beschermfactor (PF) wordt bepaald.  $PF = 100 - (\text{delta P}) * 100 / (\text{delta Pa})$ . (ref. Introductie).
- 25 Chemische analyse. 1H-, 13C-, 31P- NMR worden opgenomen op een Bruker AC 250 NMR. Fosfor wordt bepaald met een Thermofinnigan Element II (HR ICPMS).
- 30 Gel Permeation Chromatography wordt uitgevoerd op een Sephadex G-25 fine gel. Voor zuiveringen bij middel van ultrafiltratie wordt gebruik gemaakt van een Millipore "Easy load masterflex" peristaltische pomp en een Millipore prep/scale cartridge filter uit cellulose (cut-off: 1000 dalton).
- Voorbeelden.
- 35 Gepolymeriseerd Casein fosfopeptide (Produkt 2), (CPP)n. (Bijlage 1)  
Voeg 190 mg Casein fosfopeptide toe aan 2250 mg gedeïoniseerd water. Koel met ijs tot 6°C en voeg 200 mg 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDAC) toe en laat 1 nacht reageren bij 20°C.
- 40 Voeg 735 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en 408 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  toe en verhoog de pH tot 7 met 8N NaOH. Bepaal de PF-waarde met de Knoop methode.

- 5 Partieel gehydrolyseerd Phosvitin (Produkt 5)( Phos-h) ; (Mw: 22 a 30 kdal).  
200 mg phosvitin wordt opgelost in 6ml water en de pH wordt gezet op 8 met 0.1 N NaOH. Dan wordt trypsine toegevoegd ( 0.5% w/w on protein; >10000 BAEE units; Sigma Chemicals Corp.) met een incubatietijd van 5 uren bij 37°C. De reactie wordt gestopt door de pH te zetten op 5. De  
10 oplossing wordt ge-ultrafiltreerd met een membraan cut-off 10 kdal. Het produkt wordt aangezuurd over een amberlite IRC-50 kolom (zure vorm; 5% resin w/w protein) en daarna gemengd met CaCl<sub>2</sub> (0.5 M) over een periode van 1 uur. Daarna ultrafiltratie op membraan met cut-off 10 kdal en vriesdrogen.  
15 Het (Phos-h) wordt opgelost in water en aangevuld met CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O en KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in doseringen volgens tabel 'Hardheidsmetingen.voorbeeld 2; produkt 5'. De PF-waarde wordt bepaald met de Knoop methode.
- 20 Casein fosfopeptide-epsilon-polylysine-copolymeer (10)(CPP-elys)n  
Voeg 10 gram Casein fosfopeptide toe aan 86 ml gedeïoniseerd water en koel op 6°C met ijs. Voeg 1.6 gram EDAC toe. Voeg 4.1gram epsilon-polylysine toe na 15 minuten. Zet de pH op 7.8 en laat reactie 15 a 20 uren (overnacht) verder lopen bij 20°C. (Indien de viscositeit te hoog  
25 oploopt: voeg extra 40 ml water toe na 5 uren of herhaal de reactie en gebruik iets minder EDAC).  
Voeg 300 ml di-water toe en zet pH op 9. Zuiver bij middel van ultrafiltratie (Millipore prep/scale cellulose cartridge met cut-off 1000 dalton) tot een filtraat van ongeveer 2 liter bekomen is. Vriesdroog (of  
30 sproeidroog) het retentaat.  
Het (CPP-elys)n wordt opgelost in water en aangevuld met CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O en KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in doseringen volgens tabel 'Hardheidsmetingen.voorbeeld 3; produkt 10'. De PF-waarde wordt bepaald met de Knoop methode
- 35 Casein fosfopeptide-gehydrolyseerd-chitosan-copolymeer (13) (CPP x hi-Chit)n  
Voeg 155 mg-Casein fosfopeptide toe aan 2250 mg di-water. Voeg 100 mg EDAC toe en laat 1 uur reageren bij 6°C; voeg dan 35 mg chitosan oligomeer toe (Mw 2000 dalton) en 100 mg EDAC; laat overnacht reageren  
40 bij 20°C.  
Voeg CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O en KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> toe volgens tabel 'Hardheidsmetingen. Voorbeeld 3; produkt 13'. Bepaal de PF-waarde.

Phosvitin-hydrolysaat x epsilon-polylysine copolymer (produkt 16) (Phos-h x elys)n

- 5 Voeg 135 mg phosvitin hydrolysaat (produkt 5)(Phos-h) toe aan 1125 mg di-water. Voeg 55 mg epsilon-polylysine en zet pH op 8.2. Voeg 16 mg glutaminase toe en laat 1 uur reageren op 60°C.  
Voeg dan 145mg EDAC toe en laat 1 nacht reageren op 20°C.
- 10 Voeg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  toe volgens tabel 'Hardheidsmetingen'. Voorbeeld 3; produkt 16'. Bepaal de PF-waarde.

Polylysine-bisfosfonaat (elys-bisfo).

1 stap-procedure (Produkt 18)

- 15 Voeg 165 mg vinylidene bisfosfonaat (natrium zout; pH 6) toe aan 1 ml waterstofperoxide 30%; voeg 6 mg natrium tungstate en 68 mg trifluoro-azijnzuur toe; laat 1 uur reageren op kamertemperatuur; voeg dan 120 mg epsilon-polylysine toe en laat 5 uur reageren bij 50 a 55°C. Produkt slaat neer tijdens het verloop van de reactie. Verwijder het solvent door
- 20 decanteren en los de neerslag op door toevoeging van base (8N NaOH). Zuiver op een Sephadex 25 G kolom met 0.01N NaOH; vriesdroog. Voeg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  toe volgens tabel 'Hardheidsmetingen'. Voorbeeld 3; produkt 18'. Bepaal de PF-waarde.

25 Polylysine-bisfosfonaat (bijlage 2).

2 stappen-procedure (Pr. 22, koppeling in isopropanol/water bij zure pH).

- Voeg 23 gr. van het natrium zout van vinylidene bisphosphonaat (pH van waterige oplossing: 6) toe aan 85 ml waterstofperoxide 30% , 77 mg natrium tungstaat. Laat 3 uren reageren op 60°C. Voeg 160 ml aceton toe; er ontstaat
- 30 een neerslag-olie; koel en decanteer; was de neerslag-olie met aceton, decanteer en droog.
- Voeg 60 ml water toe aan de neerslag-olie van stap 1; voeg 10 gram epsilon-polylysine toe en 1.4 ml  $\text{BF}_3$ ; zet de pH op 4 met HCl en voeg 67 ml isopropanol toe. Laat 1 nacht reageren op 50 a 65 °C en plaats de pH daarna
- 35 op 6.9 met 8N NaOH. Er vormt zich een olielaag bij toevoeging van 150 ml aceton; koel en decanteer; was de olielaag met een water/aceton mengsel (50/25 vol/vol); decanteer en droog on vacuum. Voeg 300 ml di-water toe aan de olielaag en zet de pH op 9 met 8N NaOH; ultrafiltreer deze oplossing op een Millipore prepscale cartridge (cut-off 1000 dalton) met een NaOH
- 40 oplossing (200 mg/L); produceer tot meer dan 2 liter filtraat, en vriesdroog het retentaat.
- Voeg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  toe volgens tabel 'Hardheidsmetingen'. Voorbeeld 3; produkt 22'. Bepaal de PF-waarde.

- 1H-NMR (D<sub>2</sub>O): chemische shift (cs); (integratie): 1.35(2), 1.55(2), 1.75(2) en 3.2(2) CH<sub>sub2</sub> groepen van epsilon-polylysine; 3.65 (1) CH-component van epsilon-polylysine; 3.0 (0.25): nieuw signaal, is niet aanwezig in  
5 spektrum van epsilon-polylysine; CH<sub>sub2</sub> groep van gekoppeld vinylideen component (cs duidt op N-CH<sub>2</sub> koppeling en niet op O-CH<sub>2</sub> koppeling; integratie duidt op vier bisfosfonyl-groepen per epsilon-polylysine molecule van (+- 4000 a 4100 dalton).  
10 Aantal bis-fosfonylgroepen per epsilon-polylysine molecule volgens fosfor-gehalte dat gemeten is met vlamspektrofotometrie: 4.3.

2 stappen-procedure (Produkt 23, koppeling in water bij zure pH).

- Voeg 279 mg vinylidene bisfosfonaat (natrium zout; pH waterige oplossing ervan: 6) toe aan 1 ml waterstofperoxide 30%; voeg 6 mg natrium tungstate  
15 toe en laat 4 uren reageren op 70°C. Voeg 2 ml aceton toe en decanteer het solvent van de neerslag/olie; was met aceton, decanteer en droog onder vacuum. Voeg aan de neerslag/olie 120 mg epsilon-polylysine toe en 0.7 ml di-water en 1 druppel BF<sub>3</sub> en zet de pH op 4. Laat 1 nacht reageren bij 50°C en verhoog daarna de pH tot 8.2.  
20 Zuiver het mengsel op een Sephadex kolom 25-G met een waterige NaOH oplossing (200mg/L).  
Aantal bis-fosfonylgroepen per epsilon-polylysine molecuul volgens fosfor-bepalingsmethode (spectrofotometrie): 3.9.  
Voeg CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O en KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> toe volgens tabel 'Hardheidsmetingen'.  
25 Voorbeeld 3; produkt 23'. Bepaal de PF-waarde.

2 stappen-procedure (koppeling van bis-fosfonyl-component op gedenateerd epsilon-polylysine in isopropanol/water bij zure pH).

- Denatureer 120 mg epsilon-polylysine in 0.7 ml water in aanwezigheid van  
30 336 mg urea over een periode van 6 uur bij 40°C (Produktmengsel A).  
Voeg 279 mg vinylidene bisphosphonaat (natrium zout; pH waterige oplossing ervan is 6) toe aan 1 ml waterstofperoxide 30%; voeg 6 mg natrium tungstate toe en laat 4 uren reageren op 70°C. Voeg 2 ml aceton toe en decanteer het solvent van de neerslag/olie; was met aceton, decanteer en  
35 droog onder vacuum (Produkt B; epoxide).  
Voeg het produktemengsel A toe aan B. Voeg 1 druppel BF<sub>3</sub> toe en zet de pH op 4. Voeg 0.8 ml isopropanol toe en laat 1 nacht reageren bij 50°C en verhoog daarna de pH tot 6.5; voeg aceton toe. Koel en decanteer het  
solvent van de neerslag/olie; was met aceton en droog onder vacuum. Los  
40 op in 1 ml water. Het produkt wordt tweemaal gezuiverd op een Sephadex 25G kolom; eenmaal bij pH 11 met een waterige oplossing van NaOH (200 mg/L); daarna wordt de pH van de oplossing geplaatst op 6.5 en

gevriesdroogd. Tot slot een tweede zuivering op Sephadex 25G kolom met water als solvent (pH<6.5).

- 5 Aantal bis-phosphonylgroepen per epsilon-polylysine molecuul (methode vlamspectrophotometrie): 11.

2 stappen-procedure ( koppeling van bis-phosphonyl-component op gedenateerd epsilon-polylysine in isopropanol/water bij zure pH)(24).

10

Denatureer 240 mg epsilon-polylysine in 1.2 ml water in aanwezigheid van 675 mg urea over een periode van 7uur bij 40°C (produktmengsel A).

- 15 Voeg 550 mg vinylidene biphosphonaat (natrium zout; pH waterige oplossing ervan is 6.1) toe aan 2ml waterstofperoxide en 16 mg natrium tungstate. Laat 3uur en 20 minuten reageren bij 65°C en een pH van 4.6. Zet daarna de pH op 6.6 voeg aceton toe, koel en decanteer het solvent van de neerslag/olie; was met aceton en droog onder vacuum (Produkt B; epoxide).

- 20 Voeg het produktmengsel A toe aan B. Voeg 2 druppels BF<sub>3</sub> toe en zet de pH op 4.0. Voeg 1.35 ml isopropanol toe en laat één nacht reageren op 56°C. Zet daarna de pH op 6.7 en voeg aceton toe. Koel en decanteer het solvent van de neerslag/olie; was met aceton en droog onder vacuum. Los het op in water zet pH op 8.1 en zuiver bij middel van ultrafiltratie (1kdal; solvent: 20mg NaOH/L); vriesdroog het produkt.

- 25 Aantal bis-fosfonylgroepen per epsilon-polylysine molecuul: 6.3.

Chitosan-fosfonaat (produkt 25) (bijlage 3).

- 30 Voeg 100 mg chitosan (Mw 150000 dalton) toe aan 1.9 ml di-water; voeg 100 µL azijnzuur toe en roer tot alles opgelost is. Voeg daarna 4 ml isopropanol toe bij hoge mengselnelheid van de roerder. Voeg daarna 167 µL NaOH (10N) toe om het polymeer neer te slaan. Decanteer en was met een isopropanol/water mengsel 70/30 vol/vol. Zet de neerslag overnacht in de diepvries en laat daarna ontdooien.

- 35 Voeg 2.4 ml isopropanol en 0.6 ml water toe aan het geactiveerd chitosan. Voeg 408 mg Fosfomycin toe en laat op 80°C reageren over een periode van 30 uren. Koel af en voeg 2 ml aceton toe en verwijder het solvent van de neerslag. Was met een aceton/water 7/3 vol/vol mengsel en droog onder vacuum. Los de neerslag op in 3 ml water. Er verschijnt een heldere visceuze goed wateroplosbare gel die ook oplosbaar is in een neutrale of basische omgeving (in tegenstelling tot chitosan dat niet wateroplosbaar is bij een neutrale of basische pH).

40 Voeg CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O en KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> toe volgens tabel 'Hardheidsmetingen. Voorbeeld 3; produkt 25'. Bepaal de PF-waarde.



Polylysine-hydroxyphthalate (produkt 27) (bijlage 4)

- 5 Voeg 5.4 gr. epsilon-polylysine en 3.2 gr. 3-hydroxyphthalic anhydride toe aan 40 ml watervrij DMSO bij 6°C. Na 1 nacht bij 20°C is een gele olie afgescheiden. Was met aceton en droog onder vacuum. Los op in 300 ml water door toevoeging van NaOH tot een pH van 11. Ultrafiltreer het produkt bij 35°C op een Millipore prep scale cellulose cartridge (cut-off 1000 dalton) bij een druk van 1.5 bar met 0.05 N NaOH. Produceer tot >2
- 10 liter filtraat en vriesdroog het retentaat.  
Voeg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  toe volgens tabel 'Hardheidsmetingen. Voorbeeld 3; produkt 27'. Bepaal de PF-waarde.

Hardheidsmetingen. Voorbeeld 1 : algemene produkten

- 15 Code: Produktnummer (A), Experimenteel produkt (B), delta P  $\mu\text{m}$  (C), PF faktor (D), % experimenteel produkt/water w/w(E), pH (hardheidstest)(F).

A	B	C	D	E	F
I	geen / zonder speekselbehandeling	59	0	-	-
II	geen / met speekselbehandeling	59	0	-	-
III	natriumfosfaat pH 9	74.5	-38	3.3	9
IV	natrium fluoride (0.1%)	21	61.1	0.1	7.6
V	Tris(hydroxymethyl)aminoethaan	35.1	35	3.4	9

Opmerking:

- 20 delta P: het verschil in penetratie in het tandoppervlak ( $\mu\text{m}$ ) voor en na vier behandelingen; elke behandeling kent drie fazen: voorbehandeling met experimenteel produkt, onderdompelen in speeksel, en behandeling met azijnzuur. Delta Pa: het verschil in penetratie voor en na vier behandelingen met azijnzuur (geen experimenteel produkt, geen speekselbehandeling).
- 25 PF-faktor:  $100 - (\text{delta P}) * 100 / (\text{delta Pa})$ ; voorbeeld: een PF-faktor van 60 voor produkt "x", betekend dat 60% van de verzachting van het tandoppervlak dat het gevolg is van de zuurbehandeling kan vermeden worden door een voorafgaandelijke behandeling met produkt "x".
- 30 Bij experiment II wordt geen gebruik gemaakt van een experimenteel produkt, maar het tandmonster wordt wel in een speekselbad geplaatst (30 min) voor elke zuurbehandeling. Er kan vastgesteld worden dat het speeksel zelf geen beschermende kracht biedt onder deze experimentele omstandigheden (I vs II). Ook een behandeling met een anorganische base voor de zuurbehandeling heeft geen enkel effect, tenzij een tegengesteld

effect met fosfaten (produkt III). Natrium fluoride demonstreert een gemiddeld positief effect (produkt IV).

#### 5 Hardheidsmetingen. Voorbeeld 2: fosfopeptiden & Amino-peptiden

Code: Produktnummer (A), Experimenteel produkt (B), delta penetratie (C), PF-faktor (D), % peptide/water (E), % carbodiimide/water w(F), % CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O/water(G), % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/water(H), pH (hardheidstest) (I).

A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	Casein fosfopeptide (CPP)	43**	20.4	6.8		26.3	14.6	6.8
2	Gepolymeriseerd (CPP)=(CPP) <sub>n</sub>	22.6*	58.1	7.2	7.6	27.9	15.2	6.9
		37	31.5	7.4	2	28.8	15.7	8.1
3	Natuurlijk Phosvitin (Phos)	22.3*	58.7	7.1	-	25.4	14.1	7.2
4	Gehydrolyseerd (Phos) = (PPP)	51	5.6	6.3	-	24.1	13.4	7.2
5	Partieel gehydrolyseerd phosvitin, (Phos-h)	8.2	84.8	7.2	-	7.2	3.6	7.2
		7.2	86.7	7.5	-	7.2	3.6	7
6	Epsilon-polylysine (elys; e-polylysine)	23.1	57.2	2.3	-	0	0	7.3
		17.9*	66.9	3.6	-	0	0	9
		14.4	73.3	3.6	-	5.6	3.1	9

10

Opmerking: Alle doseringen werden uitgevoerd op gewichtsbasis.

\*\* : gemiddelde van drie metingen; \* : gemiddelde van twee metingen.

"% carbodiimide/water": de hoeveelheid 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide die gebruikt werd in de polymerisatiereactie en die in gehydrolyseerde vorm overgebleven is in de formulering voor hardheidsbepaling.

15

Produkt 4 (PPP): phosvitin wordt partieel gedefosforyleerd en daaropvolgend behandeld met trypsine; Mw 1-3 kdal (ref. B.Jiang et al, J.Agric.Food. Chem.,2000,48,990-994).

20

Produkt 5 (Phos-h): phosvitin wordt partieel gehydrolyseerd met trypsin en gezuiverd met ultrafiltratiemembraan cut-off 10kdal (ref.:A.Goulas, journal of Protein Chemistry, vol15, no.1,1-9,1996; (Phos-h) kan component gln49-arg212 (Mw > 20 kdal) bevatten).

25

Het is geweten dat Casein fosfopeptide (CPP) anticariogene eigenschappen bezit en dat het zich kan cumuleren op het tandoppervlak.

Het blijkt dat gepolymeriseerd (CPP), met name (CPP)<sub>n</sub>, een grotere PF-faktor heeft en daarom ook beter beschermd dan (CPP). Phosvitin (>30 kdal) dat van nature groter is dan (CPP) (1-2 kdal) biedt een PF-faktor en beschermkracht die vergelijkbaar is met die van gepolymeriseerd CPP.

30

Hydrolyse van phosvitin tot een produkt met lage moleculair gewicht (PPP)

- doet de PF faktor drastisch dalen. Zowel bij Casein fosfopeptide als bij phosvitin blijkt het belang van de grootte van het produkt ( produkt 1,2,3 en 4). Indien phosvitin gedeeltelijk gehydrolyseerd wordt en de kleinere
- 5 stukken verwijderd worden, behoudt men de relatief grotere stukken (eg. gln49-arg212). Dit produkt demonstreert de beste PF-waarde binnen de klasse van fosfopeptiden (produkt 5, PF: 85), sterker nog dan phosvitin. Epsilon-polylysine (6) heeft een dubbel zo hoge PF waarde dan
- 10 Tris(hydroxymethyl)aminoethane (V) alhoewel de molaire concentratie van amino-componenten dezelfde is. In beide gevallen werd het gecoate tandmonster ondergedompeld in een speekselbad. Het demonstreert eens te meer het belang van het gebruik van produkten met voldoende hoog moleculair gewicht.

15 Hardheidsmeting. Voorbeeld 3:

Aminopeptiden & sacchariden met calcium chelerende componenten

- Code: Produktnummer (A), Experimenteel produkt (B), delta penetratie  $\mu\text{m}$  (C), PF-faktor (D), % (peptide +saccharide)/water (E), ratio peptide/amino-
- 20 polymeer(F), % carbodiimide/water (G), %  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (H), %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /water (I), pH(voor hardheidstest) (J)

A	B
7	Casein fosfopeptide x e-polylysine copolymer (CPP x elys)n
8	Casein fosfopeptide x e-polylysine copolymer (CPP x elys)n
9	Casein fosfopeptide x e-polylysine copolymer (CPP x elys)n
10	(CPP x elys)n zuivering met ultrafiltratie
11	(CPP x elys)n + trizma base
12	(CPP x elys)n + 0.1 % natrium fluoride
13	Casein fosfopeptide x gehydrolyseerd-chitosan (CPP x hi-chit)n
14	Casein fosfopeptide x gehydrolyseerd-chitosan (CPP x hi-chit)n
15	Casein fosfopeptide/gehydrolyseerd chitosan mengsel
16	Phosvitin hydrolysaat x e-polylysine copol. (Phos-h x elys)n

A	C	D	E	F	G	H	I	J
7	11.9**	77.9	3.6	10/4.1	2.8	5.6	3.1	7.1
8	3.1	94.3	7.8	10/4.1	5.9	12.2	6.7	7.2
9	0.65*	98.8	8.1	10/4.1	6.2	12.8	7	7.7
10	2	96.3	7.8	10/4.1	1.25	6.1	3.4	8.5-9
11	3	94.4	7.8	10/4.1	1.25	6.1	3.4	8.5-9
12	0	100	3.6	10/4.1	2.8	5.7	3.1	7.5
13	20*	63	2.2	10/2.3	2.4	7.1	3.9	7.3
14	2.5*	95.5	8.4	10/2.3	8.9	26.7	13.3	7
15	30.5	43.5	2.3	10/2.3	2.4	7.2	4	7.4
16	15.9	70.6	3.6	10/4.1	-	5.7	3.1	7.2

Opmerking: (\*\*): gemiddeld van drie metingen; (\*): gemiddelde van twee metingen.

- 5 Co-polymerizatie van casein fosfopeptide met epsilon-polylysine levert betere PF-waarden in vergelijking met "gepolymeriseerd CPP(product 7,8,9 vs 2). De grootschalige produktie (10) met extra ultrafiltratie stap levert een eindprodukt op dat gezuiverd is van de kleine afbraakprodukten afkomstig van de hydrolyse van het carbodiimide. De vergelijking van de PF faktor van 10 met deze van produkten 7,8 en 9 bevestigt de beperkte
- 10 invloed van de kleinere produkten op de PF faktor. Ook toevoeging van een alternatieve kleine base, trizma, aan produkt 10 geeft geen wezenlijke verandering of verbetering. Het effect van een mengsel van (CPP x elys)n en natrium fluoride is additief (vgl. produkt 7 en 12). Het gebruik van beide laat toe om het effect van 0.1N azijnzuur op de hardheid van de tand,
- 15 volledig te neutraliseren met een relatief lage peptide concentratie (3.6%). In principe kan men in de plaats van epsilon-polylysine ook gebruik maken van wateroplosbaar gehydrolyseerd chitosan (Mw beneden de 25000 dalton) (produkt 13 en 14). Produkt 15, casein fosfopeptide x chitosan copolymeer, bezit dezelfde ingredienten als produkt 13; evenwel met dit
- 20 verschil dat het carbodiimide gehydrolyseerd geweest is in water alvorens het fosfopeptide en chitosan toe te voegen, zodat koppeling niet meer mogelijk is. Het verschil in PF-waarde tussen produkt 13 en 15 demonstreert het belang van de koppeling.
- 25 Code: Produktnummer (A), Experimenteel produkt (B), delta penetratie  $\mu\text{m}$  (C), PF-faktor (D), % (peptide + saccharide)/water (E), aantal reaktiestappen (F), %  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ /water (G), %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /water (H), pH (hardheidstest) (I).

A	B
17	e-Polylysine-bisfosfonaat (lage peroxide dosering)
18	e-Polylysine-bisfosfonaat (hoge peroxide dosering)
19	e-Polylysine-bisfosfonaat (koppeling bij basische pH)
20	e-Polylysine-bisfosfonaat (koppeling bij zure pH)
21	e-Polylysine-bisfosfonaat (koppeling bij zure pH)
22	e-Polylysine-bisfosfonaat (grootschalig, ultrafiltratie)
23	e-Polylysine-bisfosfonaat (koppeling in water)
24	Gedenatureerd e-polylysine-bisfosfonaat (koppeling zure pH)
25	Gefosfonyleerd chitosan
26	Gecarboxyleerd chitosan
27	e-Polylysine-hydroxyphthalaat

A	C	D	E	F	G	H	I
17	9.8	81.9	3.5	1	5.7	4.6	8.8
18	7*	87	3.5	1	5.7	3.2	8.8
19	2.5	95.4	3.5	2	5.7	3.2	9.4
20	0	100	3.5	2	5.7	3.2	9
21	2	96.3	3.1	2	5	2.7	8.9
22	2	96.3	3.6	2	2.8	1.5	9
22	16	70.4	1.5	2	2.8	1.5	9
23	3.8	93.1	3.5	2	5.7	3.2	9.1
24	6	88.9	1.5	2	1.2	0.7	9.4
25	50.8	5.9	2		3.7	2.1	7.5
26	52.8	2.8	3.1		1.6	-	7.7
27	5	90.7	3.6		5.6	3.1	8.7

Opmerking(\*\*): gemiddelde van twee metingen.

- 5 De polylysine-bisfosfonaat produkten (17 tot 21 en 23) werden gezuiverd op een gpc colom Sephadex G-25 fine. Alleen de produkten 22 en 24 werd gezuiverd bij middel van ultrafiltratie (Millipore prepscale cellulose cartridge cut-off 1000 dalton).
- 10 Het plaatsen van bisfosfonyl-groepen op polylysine verhoogt de PF waarde, zowel bij de 1-stap als bij de 2-stappen reactieprocedure (produkt 6,17 tot 23). Bij de 1-stap reactie is een grote overmaat waterstofperoxide bij de epoxidering van vinylidene-bisfosfonaat aangewezen (ratio H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bij produkten 17 en 18: ¼ ). De twee-stappen reactie levert een hogere PF
- 15 waarde dan de 1-stap reactie. Het is dus aanbevolen om de overmaat waterstofperoxide te verwijderen alvorens de reactie van het e-polylysine met het epoxide door te voeren (17 en 18 versus 19 tot 22). Ondanks het gebruik van een andere zuiveringsprocedure (ultrafiltratie) blijft de beschermingskracht hoog (Produkt 22). Koppeling van het epoxide aan het
- 20 polylysine in een isopropanol/water mengsel (produkt 19 tot 22) geeft een hoger PF waarde dan bij gebruik van water (produkt 23). Koppeling op gedenatureerd polylysine levert produkten (24) met een hogere pH waarde dan wanneer de koppeling uitgevoerd wordt op niet gedenatureerd polylysine (22).
- 25 Ook het plaatsen van hydroxyphthalaat-groepen op het e-polylysine verhoogt de PF-waarde (produkt 6 en 26).

#### Productie van tandmonsters voor in-vivo testen

- 30 Tandens worden in horizontale schijfjes gesneden (dikte: ongeveer 0.3 tot 1 mm) met een Leitz 1600 tandensnijder met horizontaal snijblad; uit deze schijfjes wordt manueel (met een fijne boor) kleine stukjes gezaagd die

- alleen een stukje oorspronkelijk tandoppervlak bevatten en die passen in een korte plastic omhuls. Dit wordt gezaagd uit een lange plasticen buis met 6mm buitendiameter (lengte van de omhuls is ongeveer 3 tot 6 mm); het
- 5 lege binnengedeelte wordt gevuld met een polymeer (Photoclearfil Bright; Kuraray); het tandmonster wordt dusdanig in het weke polymeer gedrukt dat het oorspronkelijke tandoppervlak nog net boven het omhulsel uitstijgt. Dan wordt het polymeer gehard met licht. Het tandoppervlak wordt gepolijst met Struers silicon carbide papier (800 – 4000) en de hardheid ervan wordt
- 10 gemeten met een Leitz-Wetzlar microscoop (50p); per tandmonsters worden vijf metingen verricht; tandmonsters met maximum 43 µm indruk lengte worden weerhouden voor gebruik in het mondstuk.

15

20

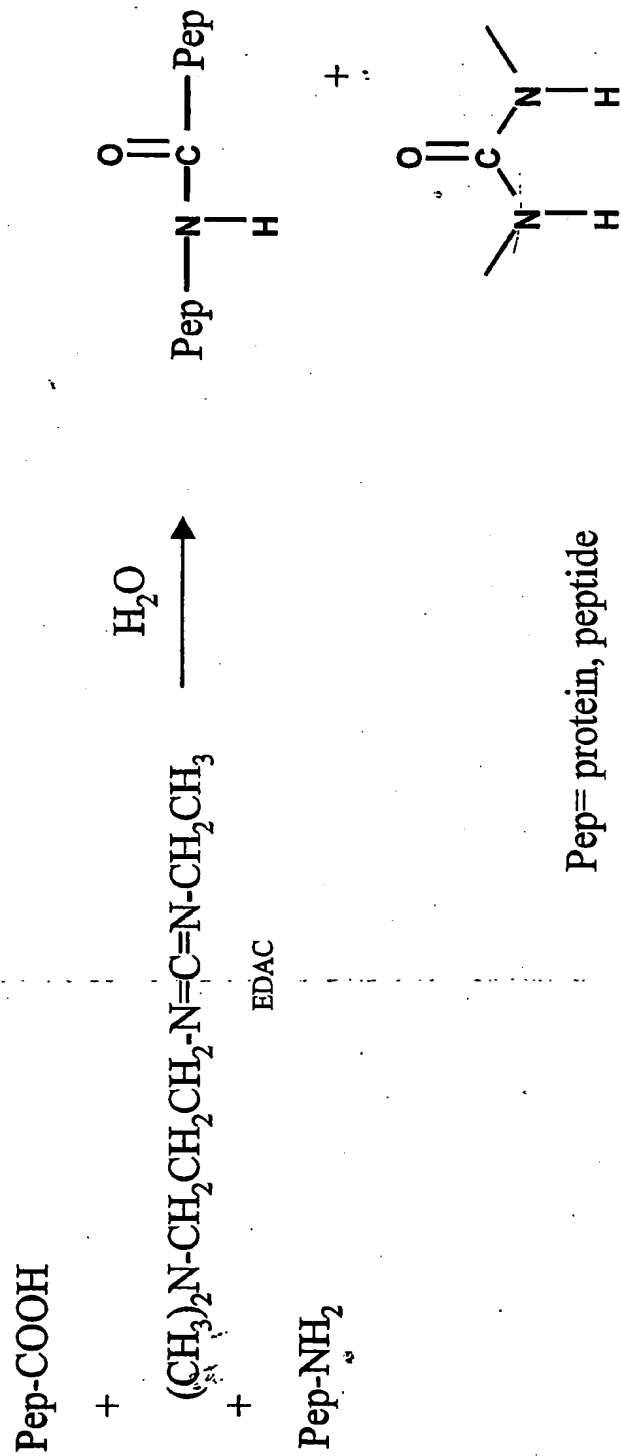
25

30

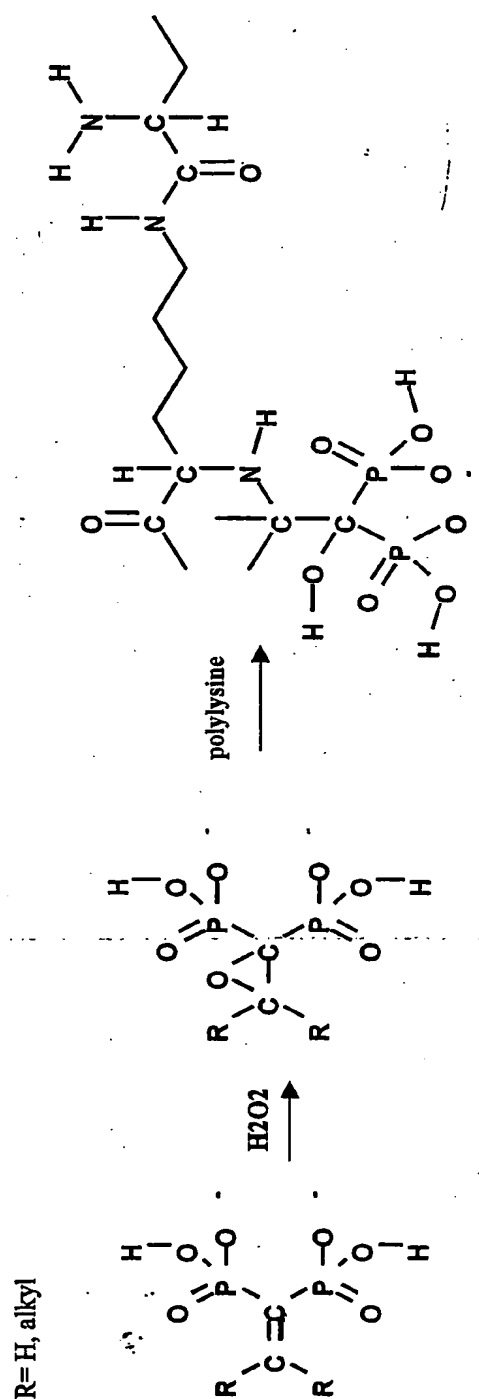
35

40

Biilage 1 : Het principe van homo- en copolymerisatie van peptiden & proteïnen met een carbodiimide.

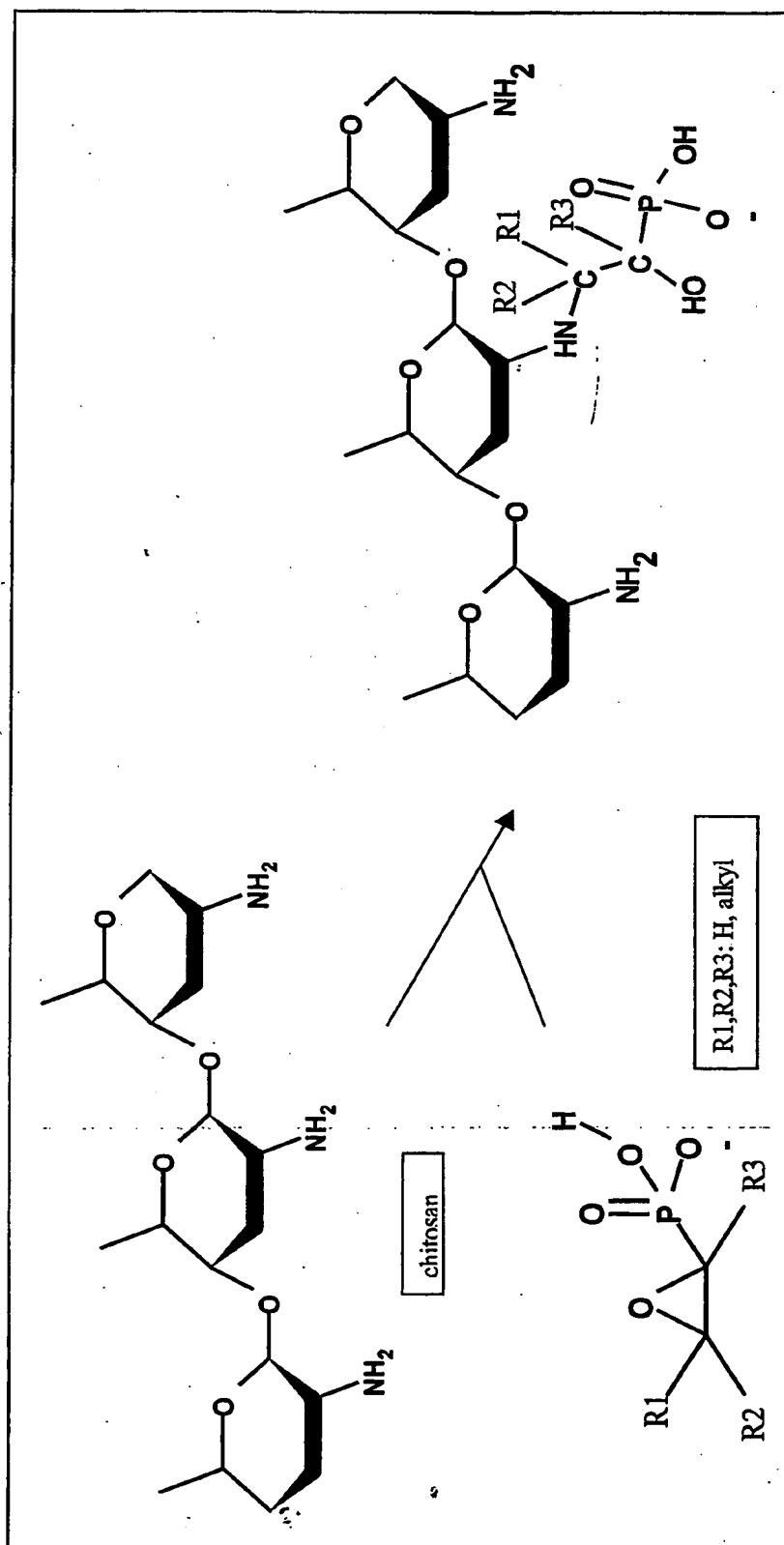


Biilage 2: De fosfonylering van epsilon-polylysine met een bisgefosfonyleerd epoxide.

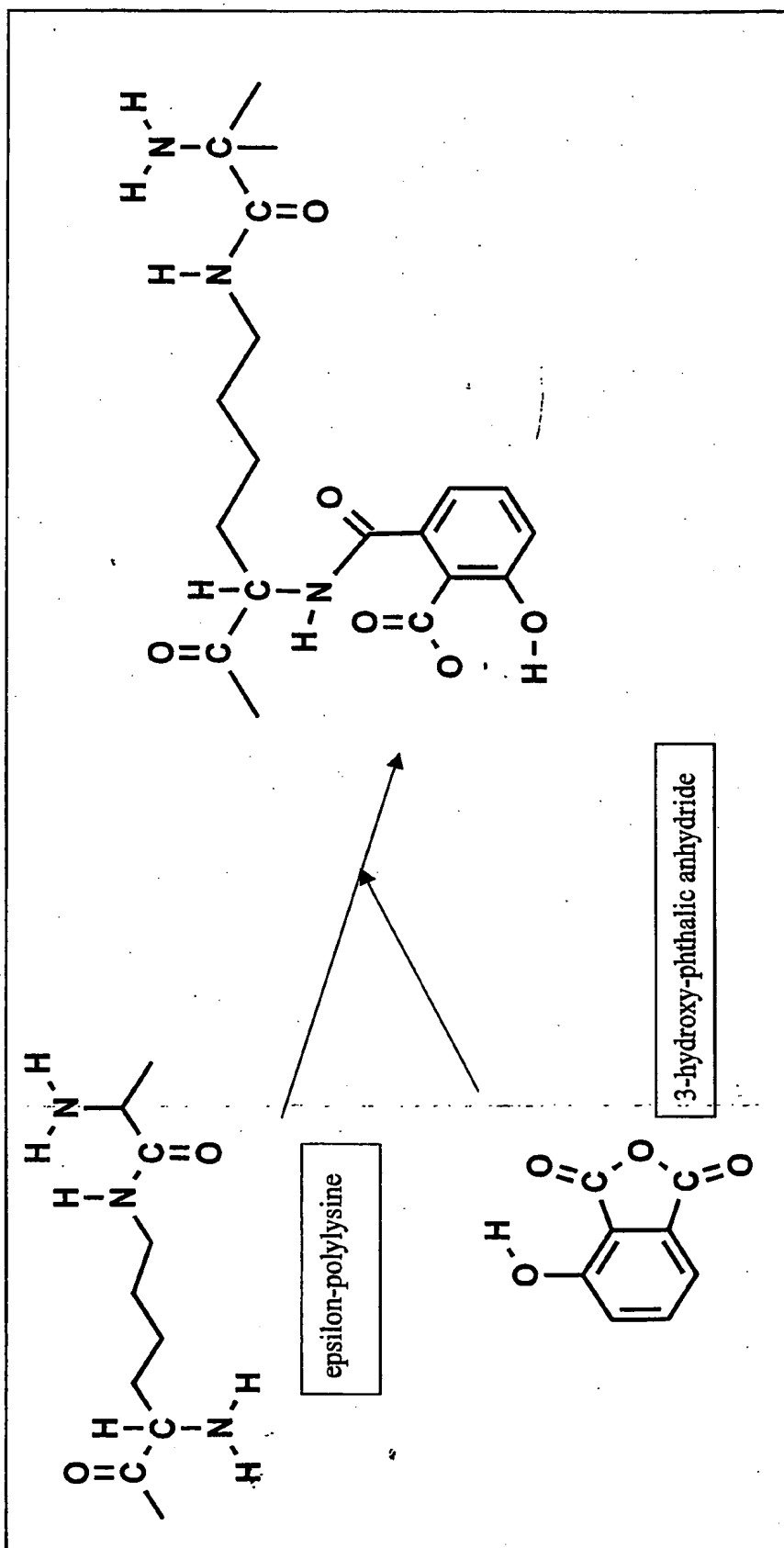




Bilage 3: De fosfonylering van chitosan met fosfomycin.



Billage 4: De reactie van epsilon-polylysine met 3-hydroxy-phthalic anhydride.



Bijlage 5 . De kwetsbaarheid van anaeroben geïsoleerd in het mondggebied en van standaard strains in aanwezigheid van de produkten (22), (6), (10) en (27).

ANAEROBEN		aantal strains	Minimum concentratie voor inhibitie (MIC) in mg/ml																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
			e-Polylysine-bisphosphonaat (22)				Epsilon-polylysine (6)				(CPP x elys)n (10)				e-Polylysine-hydroxyphthalaat(27)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
			≥3.5	1.7	0.8	0.4	0.2	≥3.5	1.7	0.8	0.4	0.2	≥3.5	1.7	0.8	0.4	0.2	≥3.5	1.7	0.8	0.4	0.2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
Gram-positive			3					3						2	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	

Bijlage 6. De kwetsbaarheid van microaerophilische bacteriën geïsoleerd in het mondbed in aanwezigheid van de producten (22), (6), (10) en (27).

MICROAEROPHILISCHE BACTERIEN	Aantal strains	Minimal e concentratie voor inhibitie (MIC) in mg/ml																			
		e-Polylysine-bisphosphonaat (22)				Epsilon-polylysine (6)				(CPP x elys)n (10)				e-Polylysine-hydroxyphthalaat(27)							
		≥3.5	1.7	0.8	0.4	0.2	≥3.5	1.7	0.8	0.4	0.2	≥3.5	1.7	0.8	0.4	0.2	≥3.5	1.7	0.8	0.4	0.2
		3	1		2		5			1								4	1	1	
Gram-negative	<i>Actinobacillus</i>	6																			
	<i>actinomycetemcomitans</i>																				
	<i>Eitenella corrodens</i>	5	1	1	1	2			1		4	3	1			1	3		1		1
	<i>Bacteroides ureolyticus</i>	4	1	1	1	1								1	1	1	5	2		1	1
	<i>Bacteroides gracilis</i>	4	1	1	1	2					1	3				3				1	3
	<i>Campylobacter spp.</i>	7	2	2		3	1	1	2	3	3	1			2	1	5	1			1
	<i>Cyanocystophaga spp.</i>	5		1		4				5	2				1	2	2		1		2
	TOTAAL	31	6	3	6	4	12	6		3	5	17	14	4	1	4	8	4	3	2	8

Bijlage 7. The kwetsbaarheid van schimmels (yeast like) geïsoleerd in het monergebied en van standaard strains in aanwezigheid van de produkten nr (22), (6), (10) en (27).

SCHIMMELS (yeast like)	Aantal strains	Minimale concentratie voor inhibitie (MIC) in mg/ml																			
		e-Polylysine-bisphosphonaat (22)				Epsilon-polylysine (6)				(CPP x elys)n (10)				e-Polylysine-hydroxyphthalaat(27)							
		≥3.5	1.7	0.8	0.4	0.2	≥3.5	1.7	0.8	0.4	0.2	≥3.5	1.7	0.8	0.4	0.2	≥3.5	1.7	0.8	0.4	0.2
<i>Candida albicans</i>	8		6	2							3	5	7	1			7	1			
<i>Candida glabrata</i>	2				2							2	1	1			2				
<i>Candida kefyr</i>	1				1							1		1			1				
<i>Candida krusei</i>	2		2									2	2				2				
<i>Candida parapsilosis</i>	2				2							2	2				2				
<i>Candida tropicalis</i>	4		3		1							2	1	1	3	1	4				
TOTAAL	19		11	2	6							2	4	13	15	3	18	1			
STANDAARD STRAINS																					
<i>Candida albicans</i> PCM 149	1		1									1			1		1				
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1		1									1			1		1				

Bijlage 8 . De kwetsbaarheid van aeroben geïsoleerd in het mondgebied en van standaard strains in de aanwezigheid van de produkten nr (22), (6), (10) en (27).

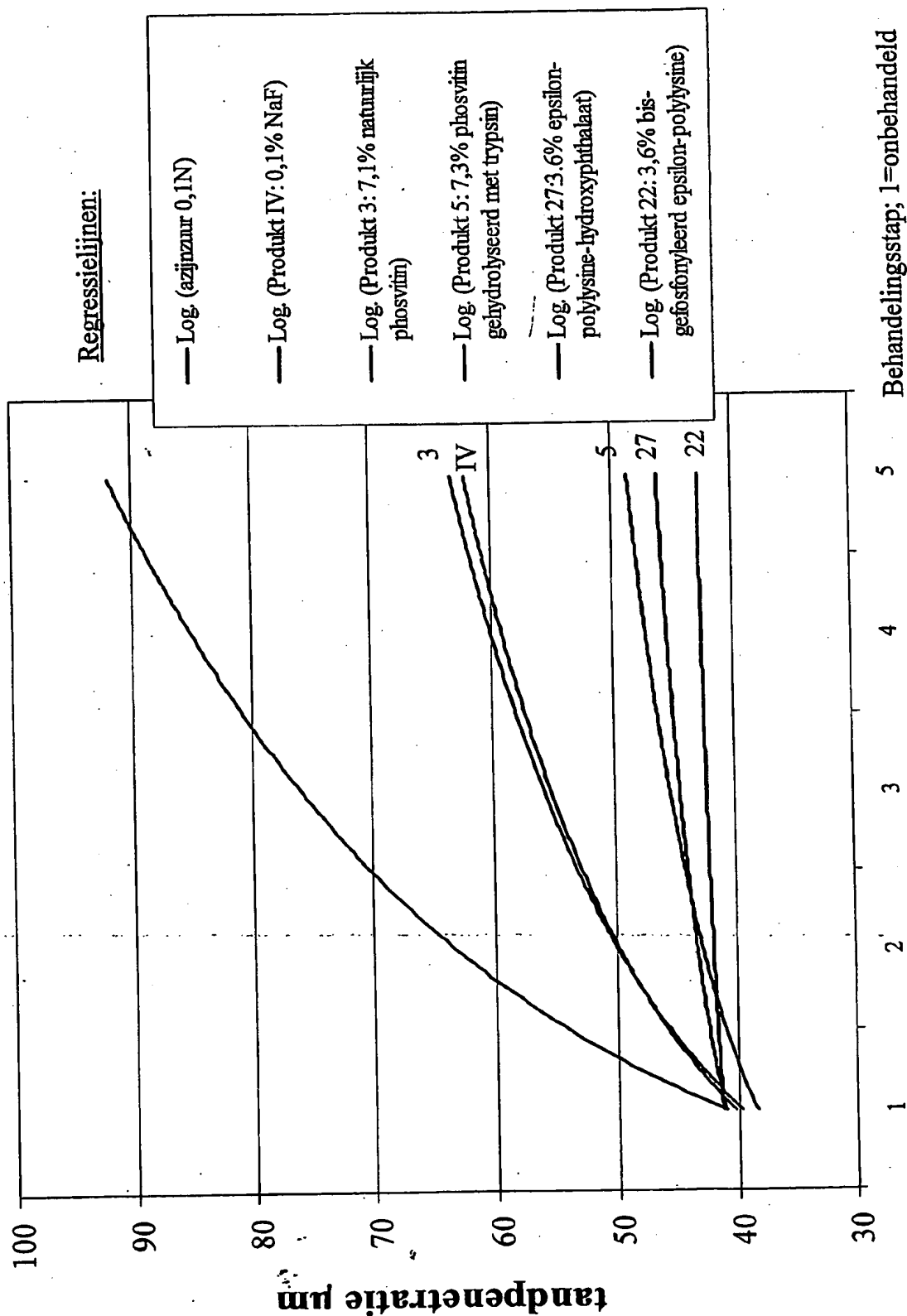
Gram	AEROBEN	Number of strains	Minimale concentratie voor inhibitie (MIC) in mg/ml														
			e-Polylysine-bisphosphonaat (22)					Epsilon-polylysine (6)					(CPP x elys)n (10)				
			≥3.5	1.7	0.8	0.4	0.2	≥3.5	1.7	0.8	0.4	0.2	≥3.5	1.7	0.8	0.4	0.2
Gram-positive	<i>Staphylococcus aureus</i>	4	4					3				1	4				4
	<i>Enterococcus faecalis</i>	2	2					1	1				2				2
	<i>Escherichia coli</i>	3	3					3					3				3
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	1					1					1				1
	<i>Acinetobacter spp.</i>	1	1									1	1				1
Gram-negative	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	5					3	1	1			5				5
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1	1					1					1				1
	TOTAAL	17	17					12	1	2		2	17				17
	STANDAARD STRAINS																
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1		1							1		1				1
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	1	1					1					1				1
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	1			1						1			1			1
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1	1					1					1				1

Bijlage 9. De kwetsbaarheid van *Streptococcus* spp. strains geïsoleerd in het mondgebied en van een standaard strain in aanwezigheid van de producten no. (22), (6), (10) en (27).

STREPTOCOCCUS spp		Aantal strains	Minimale concentratie voor inhibitie (MIC) in mg/ml											
			e-Polylysine-bisphosphonaat (22)			Epsilon-polylysine (6)			(CPP x elys)n (10)			e-Polylysine-hydroxyphthalaat(27)		
			≥3.5	1.7	0.8	0.4	0.2	≥3.5	1.7	0.8	0.4	≥3.5	1.7	0.8
Gram- positive	<i>Streptococcus mutans</i>	3		3				3				1	1	1
	<i>Streptococcus sanguis</i>	3	1	2				3				2	1	
	<i>Streptococcus salivarius</i>	3	2	1				3	2	1		2	1	
	TOTAAL	9	3	6				9	8	1		5	3	1
STANDAARD STRAIN														
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175		1			1			1						1

Bijlage: 10

**Knoop experiment: Penetratie in het tandoppervlak na 4 behandelingen met experimenteel produkt en met 0.1N azijnzuur.**





# Knoop experiment: Penetratie in het tandoppervlak na 4 behandelingen met experimenteel produkt en met 0.1N azijnzuur.

